

Univerzita Karlova v Praze  
Farmaceutická fakulta v Hradci Králové  
Katedra biologických a lékařských věd

Vplyv solubilného endoglínu na cievny endotel.  
Soluble endoglin effects on vascular endothelium.

(diplomová práce)

Vedúci diplomovej práce  
Hradec Králové 2015

Doc. PharmDr. Petr Nachtigal, PhD  
Lucia Ďaďovská

Prehlásenie:

Prehlasujem, že táto diplomová práca je mojím pôvodným autorským dielom, ktoré som vypracovala samostatne. Všetka literatúra a ďalšie zdroje, z ktorých som pri spracovávaní čerpala, sú uvedené v zozname použitej literatúry a v práci riadne citované. Práca nebola využitá k získaniu iného alebo rovnakého titulu.

Lucia Ďaďovská

Podakovanie:

Rada by som sa poďakovala doc. PharmDr. Petrovi Nachtigalovi, PhD za odborné vedenie, cenné rady a spoluprácu pri vypracovávaní mojej diplomovej práce a Mgr. Kateřině Ježkové za pomoc s experimentálnou časťou práce. Veľká vďaka patrí mojej rodine a priateľom, ktorí ma neúnavne podporovali. Kapitulu o myších modeloch venujem Žofii.

# **Abstakt**

**Univerzita Karlova v Praze**

**Farmaceutická fakulta v Hradci Králové**

**Katedra biologických a lékařských věd**

**Vplyv solubilného endoglínu na cievny endotel**

**Diplomová práca**

**Lucia Ďaďovská**

**Vedúci práce: doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.**

Cieľ práce: V tejto diplomovej práci sme sledovali vplyv solubilného endoglínu na expresiu adhézneho molekuly VCAM-1 a výskyt makrofágov v stene descendentnej aorty myšieho modelu. Analýza prebehla pomocou imunohistochemických metód s fluorescenčnou detekciou.

Metódy: Boli použité geneticky modifikované myši s vysokou produkciou ľudského solubilného endoglínu (Sol-Eng+), zatiaľčo myši s nízkou hladinou solubilného endoglínu tvorili kontrolnú skupinu. Obe skupiny boli rovnakého veku a počas celého experimentu prebiehajúceho tri mesiace boli na vysokotukovej diéte. K analýze výsledkov boli pripravené tkanivové rezy a použité imunohistochemické metódy s detekciou vo fluorescenčnom mikroskope.

Výsledky: Imunohistochemicky sa nepreukázal výskyt makrofágov v zhotovených tkanivových rezoch descendentnej aorty myši kontrolnej skupiny ani myši Sol-Eng+. Imunohistochemická analýza expresie VCAM-1 v descendentnej aorte nepoukazuje na žiadne rozdiely v sile a lokalizácii expresie VCAM-1 medzi kontrolnou skupinou a myšami Sol-Eng+. Detekovali sme silnú expresiu výhradne na povrchu endotelu, teda na rovnakých miestach v oboch skupinách. Ani v jednej skupine nebola preukázaná žiadna expresia viazaná na iné oblasti, napr. médie.

Záver: Nulové osídlenie skúmanej časti descendentnej aorty makrofágmi v oboch skupinách naznačuje, že k infiltrácii cievnej steny neviedli vysoké hladiny solubilného endoglínu v kombinácii s vysokotukovou diétou. Expresia VCAM-1 bola síce silnejšia, ale rovnako zastúpená a lokalizovaná v oboch skupinách. Získané výsledky nenasvedčujú tomu, že vysoké hladiny solubilného endoglínu v tejto diplomovej práci vyvolali endotelovú dysfunkciu.

# **Abstract**

**Charles University in Prague**

**Faculty of Pharmacy in Hradec Králové**

**Department of Biological and Medical Sciences**

**Soluble endoglin effects on vascular endothelium**

**Diploma thesis**

**Lucia Ďadřovská**

**Supervisor: doc. PharmDr. Petr Nachtigal, Ph.D.**

**Background:** We observed the effect of soluble endoglin on expression of VCAM-1 and occurrence of macrophages in descendent aorta in murine models. Analysis was performed by immunohistochemical methods with fluorescence detection.

**Methods:** In this study, we used the transgenic mice overexpressing human soluble endoglin (Sol-Eng+) and control mice with low plasma levels. The both groups were the same age and during the entire three months experiment were fed high fat rodent diet. For results analysis, we used tissue sections of descendent aorta and immunohistochemical methods with fluorescence microscopy detection.

**Results:** Immunohistochemistry showed there was not an evidence of macrophage infiltration in tissue samples of descendent aorta in either control mice or in Sol-Eng+ mice. Immunohistochemical analysis of VCAM-1 expression in descendent aorta of control mice and of Sol-Eng+ mice presented no difference in localization and strength of VCAM-1 expression in both groups. Increased VCAM-1 expression was detected at the exactly same location in both groups - only on the endothelium surface. In other vessel regions, for example, tunica media, no VCAM-1 expression was found.

**Conclusions:** No occurrence of macrophages in tested descendent aorta part in both groups shows that soluble endoglin in combination with high fat diet did not cause macrophage infiltration of vessel wall. Although, VCAM-1 expression was increased it has the same intensity and localization in both groups. In this diploma thesis, obtained results suggest that high levels of soluble endoglin did not induce endothelial dysfunction.

## Obsah

1	Teoretická časť .....	8
1.1	Úvod.....	8
1.2	Cievy .....	9
1.2.1	Stavba ciev .....	9
1.2.2	Základné rozdelenie ciev .....	11
1.3	Endotel .....	12
1.3.1	Funkcia endotelu .....	12
1.3.2	Endotelová dysfunkcia .....	14
1.4	Ateroskleróza.....	15
1.4.1	Hypercholesterolémia – významný rizikový faktor.....	16
1.4.2	Endotelová dysfunkcia v patogenéze aterosklerózy.....	18
1.4.3	Fázy aterosklerózy.....	19
1.5	Adhézne molekuly .....	22
1.6	Cytokíny .....	25
1.7	Endoglin .....	27
1.7.1	TGF- $\beta$ signalizačná dráha.....	27
1.7.2	Solubilný endoglin .....	28
1.8	Myšie modely aterosklerózy.....	29
1.8.1	ApoE deficientný model.....	30
1.8.2	LDL-receptor deficientný model.....	30
1.9	Imunohistochemia.....	31
1.9.1	Priama metóda.....	31
1.9.2	Nepriame metódy .....	31
2	Zadanie diplomovej práce, cieľ práce .....	33
3	Experimentálna časť.....	34
3.1	Použité zvieratá a ich predpísaná diéta .....	34

3.2	Imunohistochémia.....	34
3.3	Výsledky.....	37
3.3.1	Imunohistochemická analýza výskytu makrofágov .....	37
3.3.2	Imunohistochemická analýza expresie VCAM-1 .....	42
4	Diskusia .....	49
5	Záver .....	51
6	Použité skratky.....	52
7	Citovaná literatúra.....	54
8	Zoznam obrázkov.....	61
9	Zoznam tabuliek .....	62

# 1 Teoretická časť

## 1.1 Úvod

Kardiovaskulárne choroby (KVO) sú najčastejšou príčinou úmrtnosti obyvateľstva priemyselne rozvinutých krajín (1). Podľa štatistík Svetovej zdravotníckej organizácie (WHO) je 31% úmrtí celosvetovo dôsledkom KVO (2). Sú to ochorenia, ako je napr. ischemická choroba srdca, ischemická choroba dolných končatín, cievna mozgová príhoda, angina pectoris. Patologickým stavom vyúsťujúcim v KVO je ateroskleróza (1).

Ateroskleróza bola spočiatku považovaná len za degeneratívne poškodenie metabolizmu lipidov a ich ukladanie sa v cievnej stene. Dnes je zrejmé, že sa jedná o zápalové ochorenie prebiehajúce v cievnej stene s účasťou zápalových buniek (3) - monocytov meniacich sa na makrofágy, lymfocytov, buniek hladkej svaloviny a aktivovaných endotelových buniek. Výsledkom je tvorba aterosklerotického plátu. Cievu zužuje a pri erózii alebo ruptúre na neho nasadá trombus. Dochádza k celkovému uzavretiu cievy a ischémii tkaniva. KVO teda vznikajú na podklade rozvoja aterosklerózy a sú jej klinickou manifestáciou (1).

Pláty sa začínajú formovať po dvadsiatom alebo tridsiatom roku života, ale ich tvorba je pozvoľná – prvé príznaky ochorenia sa objavujú až o niekoľko desaťročí neskôr. Často ako akútny infarkt myokardu alebo cievna mozgová príhoda. Lézie sa objavujú najčastejšie v stredných svalových a elastických artériách srdca, mozgu a dolných končatín, zatiaľčo v cievach horných končatín sa vo všeobecnosti nevyskytujú vôbec (3).

Slovo ateroskleróza vzniklo z gréckeho „athera“, vo význame ovsená kaša a latinského „skleros“, teda tvrdý. Odkazuje na voľné depozity tukov v pláte a stratu elasticity ciev (4).

Ovplyvniteľné rizikové faktory aterosklerózy sú prvotným cieľom terapie. Zmena životného štýlu a nasadenie hypolipidémik spomaľuje rozvoj ochorenia a oddiaľuje klinické prejavy s možnými fatálnymi následkami. Veľmi dôležitá je prevencia, pretože vznik plátov je ireverzibilný (1).



## 1.2 Cievny

Cievny sú súčasťou obehového systému. Ten sa skladá z dvoch zložiek – srdcovocievneho (kardiovaskulárneho) systému, ktorého úlohou je transportovať krv skrz organizmus, a lymfatického systému, ktorý sa uplatňuje pri zbieraní prebytkov extracelulárnej tekutiny (lymfy) a jej následnom navracaní do kardiovaskulárneho systému (5).

### 1.2.1 Stavba ciev

Cievny pozostávajú z troch základných, koncentricky usporiadaných vrstiev - tunica intima, tunica media a tunica adventitia.

#### Tunica intima

Skladá sa z jednej súvislej vrstvy endotelových buniek dlaždicovitého charakteru, ktoré tesne lemujú lumen cievy, subendotelového spojivového tkaniva a membrany elastica interna (5). Membrana elastica interna je tvorená sieťovito usporiadanými elastickými a kolagénnymi vláknami alebo elastickými blankami, na ktoré endotelové bunky nasadajú (6).

#### Tunica media

V stredných a veľkých artériách vytvára najhrubšiu a najvýraznejšiu vrstvu (7). Je tvorená cirkulárne usporiadanými bunkami hladkej svaloviny, kolagénneho a elastického spojivového tkaniva. V prípade artérií aj externou elastickou laminou. Podiel elastických vlákien značne narastá s veľkosťou a typom cievy, napr. v tepnách elastického typu. V tepnách svalového typu prevláda svalový prvok (5) (6).

#### Tunica adventitia

Niekedy označovaná ako tunica externa, vytvára z fibrilárneho väziva, elastického a kolagénneho tkaniva, v žilách aj z hladkých svalových buniek, najvrchnejšiu vrstvu cievnej steny. Tieto zložky prenikajú aj do väziva v bezprostrednom okolí cievy, kde ju upevňujú. Vo väčších cievach je v tejto vrstve uložené vasa vasorum – sieť malých ciev, ktorých úlohou je zásobovať tunicu mediu a adventitiu. Hranicu medzi vrstvami tvorí membrana elastica externa, ktorá ich oddeľuje. Tunica adventitia je v žilách oveľa hrubšia než v artériách (5) (6).

Obrázok č. 1: Stavba cievnej steny, porovnanie tepny, žily a kapiláry  
<http://galleryhip.com/capillaries-veins-and-arteries-structure-and-function.html> (27.1.2015)

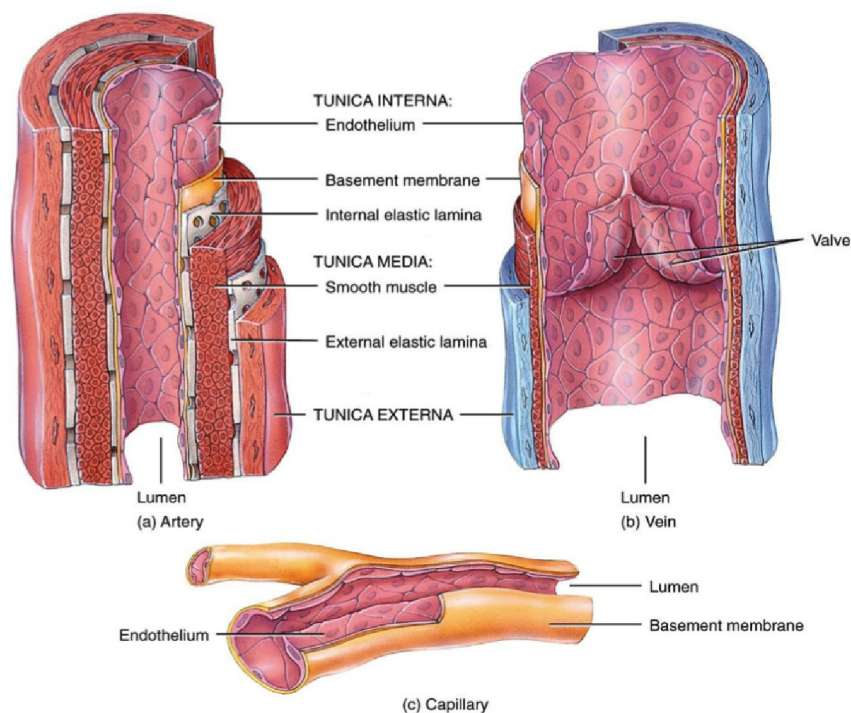
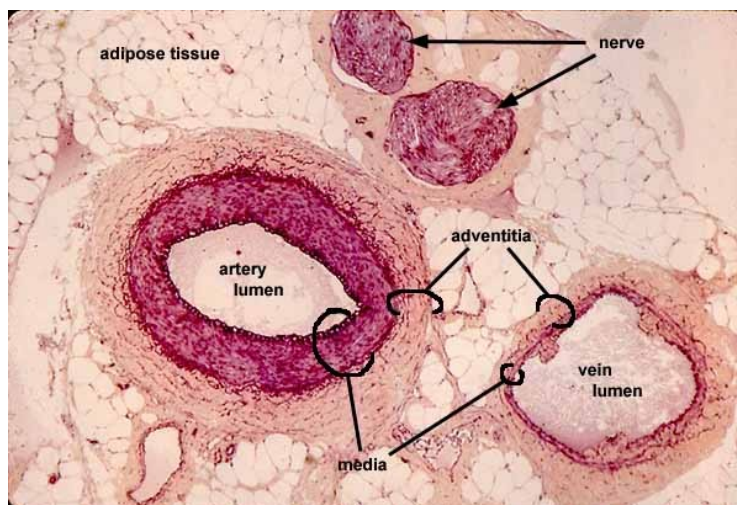


Figure 21.31abc Tortora - PAP 12/e  
 Copyright © John Wiley and Sons, Inc. All rights reserved.

Výživa prichádza cez vasa vasorum až po médiu. V prípade artérií, intima a vnútorná strana média získavajú živiny z prúdiacej krvi. Žily zásobuje vasa vasorum siahajúca až to intimy. Média a adventitia zaistujú kontraktilitu a elasticitu, a tým v tepnách tok krvi smerom k tkanivám (6) (7).

Obrázok č. 2: Koncentricky usporiadané jednotlivé vrstvy steny ciev  
<http://www.siumed.edu/~dking2/crr/CR019b.htm> (27.1.2015)



### 1.2.2 Základné rozdelenie ciev

Na podklade uloženia ciev v daných častiach obehovej sústavy a s tým spätými rozdielmi v požiadavkách na ich funkčnosť, vznikajú jemné odlišnosti v ich stavbe. Rozlišujeme artérie, žily a kapiláry (6).

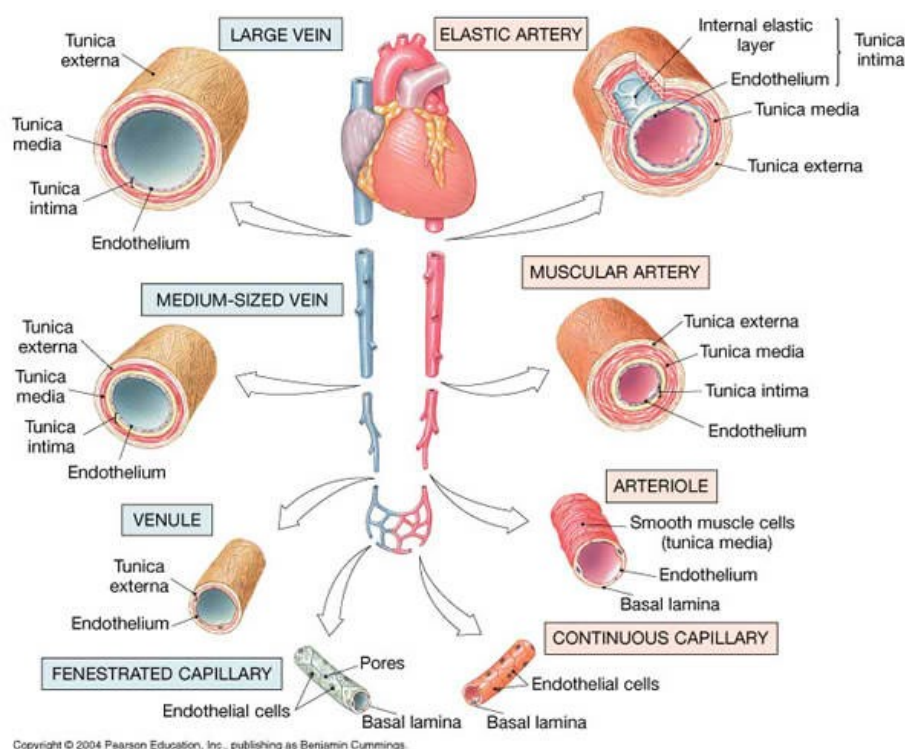
Artérie vedú krv od srdca. Elastické artérie, napr. aorta, sú najväčšie z artérií, napájajú sa priamo na srdce. Pre ne typická hojnosť elastických vlákien je nutná nielen pre zabezpečenie štrukturálnej stability a umožnenie rozťažiteľnosti, ale hlavne pre udržanie krvného tlaku (5). Ako krv prúdi zo srdca priamo do elastických artérií, musia čeliť pravidelným cyklickým zmenám krvného tlaku medzi jednotlivými údermi srdca (6). 40% podielu aortálnej steny predstavujú špirálovite prepletené elastické vlákna spolu s kolagénnymi vláknami zabezpečujúcimi jej pružnosť, rozťažiteľnosť a popritom pevnosť. Množstvo elastických vlákien v periférnejších artériách postupne klesá, stúpa ich tuhosť (7). Svalové artérie majú tunicu mediu zloženú z mnohých vrstiev hladkej svaloviny a distribuujú krv do rozličných orgánov a tkanív. Arterioly sú najmenšie a zodpovedajú za reguláciu krvného tlaku. Metarterioly obsahujú len nekompletné vrstvy svalových buniek. Sú terminálnym koncom arterioli napájajúcim sa na kapilárne riečisko. Nachádzajú sa v nich nekompletné prstence z hladkých svalových buniek. Prstence obklopujú začiatok kapilár a sú schopné regulovať krvný prietok (5).

Kapiláry (vlásočnice) sú veľmi malé cievy (priemer okolo 7  $\mu\text{m}$ ) pozostávajúce z jednej vrstvy endotelových buniek obkolesených laminou bazalis. Disponujú schopnosťou selektívnej permeability a spolu s venulami sa podieľajú na výmene dýchacích plynov, metabolitov a ďalších látok medzi krvným riečiskom a tkanivami (6). Kapiláry so súvislou výstelkou nie sú fenestrované, majú celistvú bazálnu laminu. Nájdeme ich v oblastiach, ako sú napríklad periférne nervové vlákna, kostrové svaly, pľúca a týmus (5). Fenestrované kapiláry sú penetrované pórmí pokrytými ultratenkou blankou nazývanou diafragma. Lamina bazalis tvorí súvislú vrstvu z vonkajšej strany diafragmy (6). Lokalizované sú v endokrinných žľazách, pankrease, lamine proprii v semenníkoch. V glomerule obličiek sa nachádzajú kapiláry podobné fenestrovaným, rozdiel spočíva v neprítomnosti diafragmy. Sinusoidné kapiláry sú omnoho väčšie ako ostatné. Bazálna lamina tu nie je súvislá, intercelulárne spojenia medzi endotelovými bunkami vykazujú medzery, čo umožňuje unikanie materiálu z a do cievy. Ich endotelové bunky môžu vykonávať fagocytózu. Typické sú pre lymfatické uzliny, pečeň, kostnú dreň, kôru nadobličiek (5) (6).

Žily vedú krv z tkanív do srdca nízkotlakovým riečiskom. Majú menej vrstiev hladkých svalov v tunice medii, ale väčšie lumen v porovnaní s artériami (5). Membrana elastica interna sa nachádza v tunice intime len v stredných a väčších žilách. Mnohé obsahujú chlopne zabraňujúce spätnému prúdeniu krvi. Chlopňa je výstupok intimy spevnený väzivom, na luminálnej strane sa nachádza endotel (6).

Obrázok č. 3: Zmeny v stavbe cievnej steny v súvislosti s lokalizáciou ciev

<http://itsmorefuninanaphyy.weebly.com/blood-vessels-and-circulation.html> (27.1.2015)



## 1.3 Endotel

Endotel tvorí vnútornú vrstvu ciev. Pozostáva z dlaždicovitých buniek nepravidelného tvaru, pozdĺžneho v smere toku krvi. Povrch endotelu činí približne 500 – 1000 m<sup>2</sup>, čo vytvára viac než dostatočný priestor potrebný na výmenu informácií medzi cirkulujúcimi bunkami a cievnu stenou (7).

### 1.3.1 Funkcia endotelu

Endotel sa uplatňuje nielen ako mechanická bariéra zabezpečujúca selektívny transport látok (lipoproteíny, inzulín) (4), ale aj schopnosťou zachytávať signály z lumenu cievy, reagovať na ne tvorbou chemických poslov, a tak zabezpečovať

komunikáciu s hladkou svalovinou a cirkulujúcimi bunkami. Je pokladaný za najväčší endokrinný orgán ľudského organizmu (7) (8).

Uloženie endotelu medzi prúdiacou krvou a stenou cievy, respektíve bunkami hladkej svaloviny, z neho robí nástroj lokálnej regulácie cievneho tonu, prietoku krvi a krvného tlaku. Produkcia prostacyklínu (PGI<sub>2</sub>), endotelového hyperpolarizačného faktoru (EDHF) (7) alebo oxidu dusnatého (NO) vedie k relaxácii hladkého svalstva ciev. NO, nazývaný aj endotelový relaxačný faktor, je neustále syntetizovaný z aminokyseliny L-arginínu pomocou enzýmu NO-syntáza a zabezpečuje základnú dilatáciu (8).

Naopak vazokonstrikcia je docielená produkciou endotelínu, najvýznamnejší je endotelín-1, vazokonstrikčných prostanoidov ako je tromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). Ďalší spôsob vazokonstrikčného pôsobenia predstavuje angiotenzín konvertujúci enzým (ACE) uložený na povrchu endotelu. ACE aktivuje nielen angiotenzín II a inaktivuje bradykinín, ale má aj vplyv na syntézu endotelínu-1 (7).

Protromboticky pôsobí tvorbou TXA<sub>2</sub>, endotelínu-1, inhibítora plazminogénu (PAI), von Willebrandovho faktoru. V nepoškodenom endotele ale prevažujú antikoagulačné a antiagregačné faktory. Proti aktivácii a agregácii trombocytov pôsobí prostacyklín (PGI<sub>2</sub>), tkanivový aktivátor plazminogénu (t-PA), trombomodulín a NO. Povrch endotelu získava silné antikoagulačné vlastnosti (7) (9).

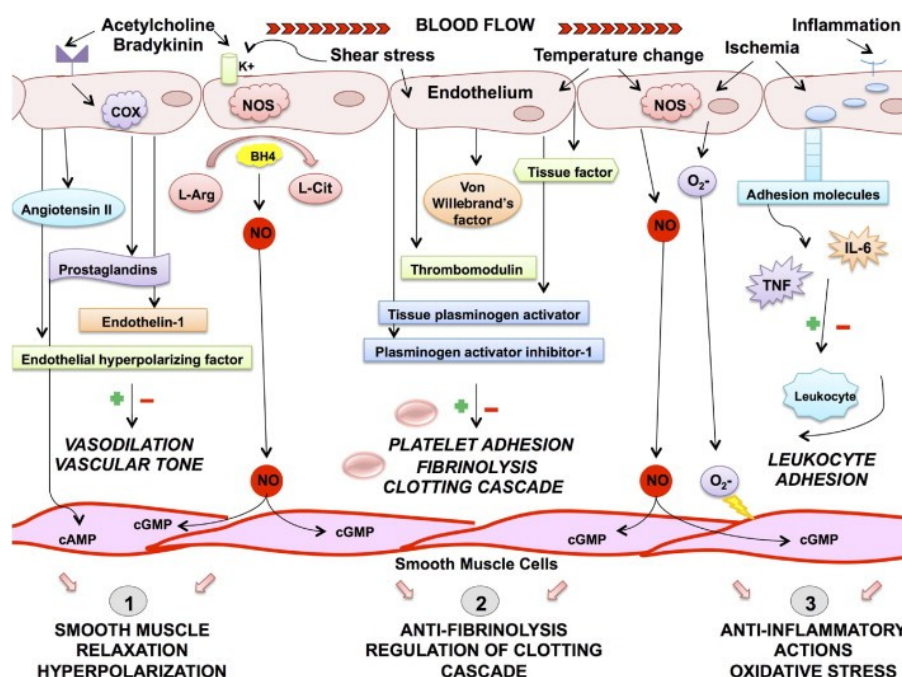
Zohráva úlohu aj pri angiogenéze. Podporuje proliferáciu buniek rastovými faktormi ako je endotelový rastový faktor (EGF), doštičkový rastový faktor (PDGF), vaskulárny endotelový rastový faktor (VEGF) a angiotenzín II. Inhibovať bunkový rast môže prostredníctvom NO, transformujúceho rastového faktoru – TGF- $\beta$  a PGI<sub>2</sub> (9).

Produkcie adhézne molekuly (E-selektíny, ICAM-1) a cytokíny. Tým ovplyvňuje priebeh zápalových reakcií (9).

Fyziologicky prevláda vazodilatácia, inhibícia aktivácie trombocytov a leukocytov, antiagregačné a antitrombotické účinky. Endotelové bunky zohrávajú podstatnú rolu v krátkodobej, ale aj dlhodobej kontrole kardiovaskulárnych funkcií (7).

## Obrázok č. 4: Znáozornenie endotelových funkcií

<http://content.onlinejacc.org/article.aspx?articleid=1361775> (10.2:2015)



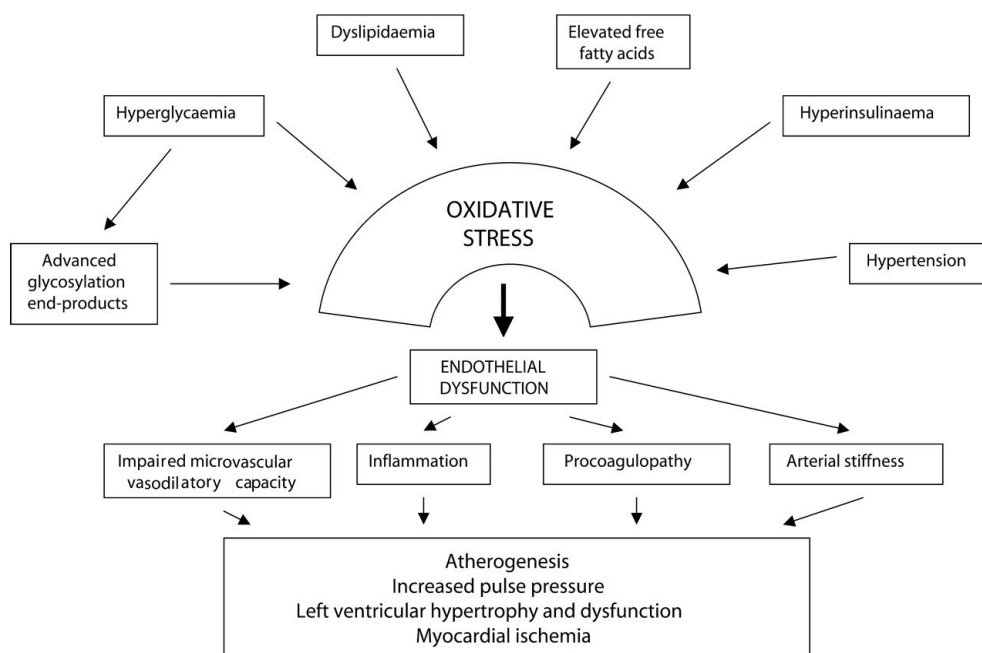
### 1.3.2 Endotelová dysfunkcia

Je to defekt endotelu, hlavne čo sa týka prekonstrikčných a prezápalových účinkov. Príčinou môže byť priame poškodenie spôsobené hyperlipidémiou, hypertenziou, oxidačne modifikovaným LDL, voľnými radikálmi, diabetom mellitom či fajčením (4). Vazodilatácia je obmedzená kvôli zníženej produkcii NO a pôsobeniu kyslíkových radikálov. NO sa považuje za ateroprotektívny faktor. Okrem vazodilatácie a krvného tlaku reguluje aj aktiváciu trombocytov a zápal (7) (10).

Dochádza k zvýšenej produkcii cytoadhézných molekúl, endotel sa stáva príľnavejším pre monocyty a T lymfocyty – dochádza k ich adherencii a potom k prestupu do subendotelu (8). Endotel sa stáva hyperadhéznym pre trombocyty (11). Kyslíkové radikály oxidujú LDL, vznikajúca ox-LDL forma má 8 až 10-krát vyššiu afinitu k scavenger receptoru makrofágov v porovnaní s normálnym LDL. Dysfunkčný endotel je pre LDL priepustný – nezabráni ich prestupu do intimy (7). Okrem lipidov umožňuje prechod do cievnej steny aj zápalovým bunkám (10).

Obrázok č. 5: Príčiny a dôsledky endotelovej dysfunkcie

<http://qjmed.oxfordjournals.org/content/97/8/537> (10.2.2015)



Poškodenie endotelu vedie k zápalovej reakcii a reparatívnym procesom. Následkom je vytvorenie aterosklerotického plátu až oklúzie cievy (7). Prebiehajúca endotelová dysfunkcia je podkladom pre rozvoj aterosklerózy a akútneho koronárneho syndrómu (8).

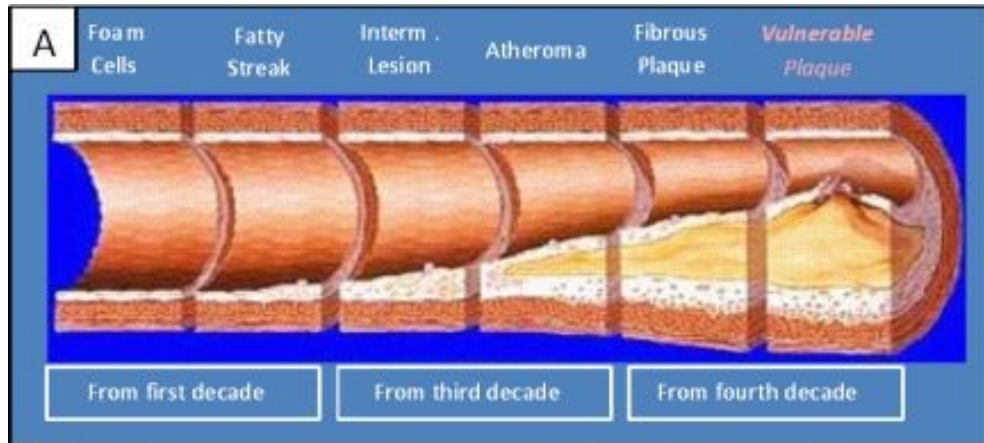
## 1.4 Ateroskleróza

Endotelová dysfunkcia je základom mnohých kardiovaskulárnych porúch a prvým príznakom alebo dôležitým stupňom začínajúcej aterosklerózy (7) (4). Definuje sa ako zápalová fibro-proliferatívna odpoveď na rôzne poškodenia endotelu (10). Ateroskleróza patrí k najvýraznejším ochoreniam postihujúcim západné civilizácie. Aterosklerotické lézie nie sú rovnomerne rozmiestnené vo všetkých tepnách. Je badateľný ich preferenčný výskyt v koronárnych artériách, hrudnej aorte, artérii poplitea a vnútorných karotických artériách (4).



Obrázok č. 6: Postupný rozvoj aterosklerotického plátu

<http://www.remedi.uzh.ch/research/disease.html> (22.2.2015)



Rizikové faktory aterosklerózy narúšajú homeostázu endotelu. Vzniká endotelová dysfunkcia a následne ateroskleróza. Rizikový faktor nemusí byť sám o sebe príčinou, ale jeho prítomnosť naznačuje vysokú pravdepodobnosť vypuknutia choroby. (4). Funkčnosť endotelu sa dá podporiť napríklad zlepšením hypertenzie, elimináciou fajčenia, nasadením hypolipidémik

Rizikové faktory aterosklerózy:

Neovplyvniteľné:

- Vek
- Pohlavie
- Rodinná anamnéza

Ovplyvniteľné:

- Hypercholesterolémia
- Fajčenie
- Arteriálna hypertenzia
- Nedostatočná fyzická aktivita
- Obezita – hlavne abdominálna
- Diabetes mellitus a porušená glukózová tolerancia (1)

#### 1.4.1 Hypercholesterolémia – významný rizikový faktor

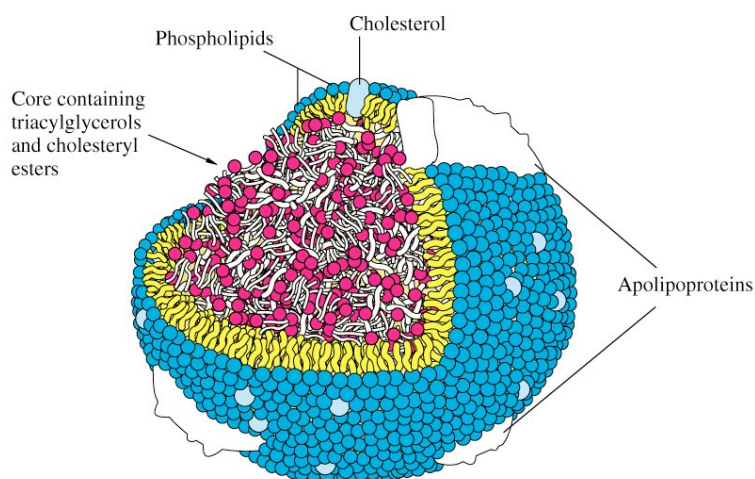
Hypercholesterolémia je porucha metabolizmu lipidov prejavujúca sa zvýšením plazmatických hladín cholesterolu ( $\geq 5,2$  mmol/l) (12). Ide o vrodené poškodenie LDL – receptoru. Je to dôležitý rizikový faktor aterosklerózy. Riziko ICH stúpa už od hodnoty cholesterolémie 4,8 mmol/l. Pri súčasnom fajčení a hypertenzii sa zvyšuje niekoľkonásobne (1).



Triacylglyceroly (TAG) a cholesterol ako hydrofóbne častice musia byť počas cirkulácie v krvi naviazané na lipoproteíny. Vnútro lipoproteínu je hydrofóbne – lipidové. Vonkajšia hydrofilná vrstva je tvorená fosfolipidmi, voľným cholesterolom a apolipoproteínmi (12).

Obrázok č. 7: Štruktúra lipoproteínovej častice

<http://apbrwww5.apsu.edu/thompsonj/Anatomy%20&%20Physiology/2020/2020%20Exam%20Reviews/Exam%201/CH18%20Lipoproteins.htm> (22.2.2015)



Na základe rozdielneho lipidového a proteínového zloženia, veľkosti a funkcie rozoznávame viacero typov lipoproteínov (1).

Chylomikrony nesú TAG a cholesterol z tráviaceho systému do pečene.

HDL (high density lipoproteins) transportuje cholesterol z periférie do pečene.

VLDL (very low density lipoproteins) viaže endogénne TAG vznikajúce v pečeni, na periférii je štiepený za vzniku LDL s obsahom cholesterolových esterov (1) (12).

LDL (low density lipoproteins) obsahujú cholesterolové estery a sú vychytávané LDL-receptorom na hepatocytoch (1) (12). Prebytok LDL-častíc je modifikovaný hlavne oxidačne. Dysfunkčný endotel a aktivované bunky produkujú voľné radikály, ktoré oxidujú LDL-častice. Oxidované LDL-častice (ox-LDL) strácajú afinitu k LDL-receptorom a vychytávajú ich scavenger receptory na makrofágoch (12).

Zvýšená plazmatická koncentrácia LDL-častíc poškodzuje endotelové bunky. Aktivovaný endotel reaguje zvýšením permeability pre LDL-častice a ďalšie lipoproteíny. Dochádza k ich hromadeniu v subendotelovom priestore. LDL-častice zohrávajú veľmi dôležitú úlohu v patogenéze aterosklerózy. Nielenže endotel poškodzujú

a iniciujú vznik endotelovej dysfunkcie, ale podieľajú sa aj na progrese aterosklerózy (10).

Ox-LDL inhibuje mitogénne účinky PDGF v endotele a bráni tak jeho regenerácii, ale proliferáciu hladkých svalových buniek pôsobením PDGF naopak stimuluje (13).

Tabuľka č. 1: Optimálne plazmatické hodnoty lipidov (1)

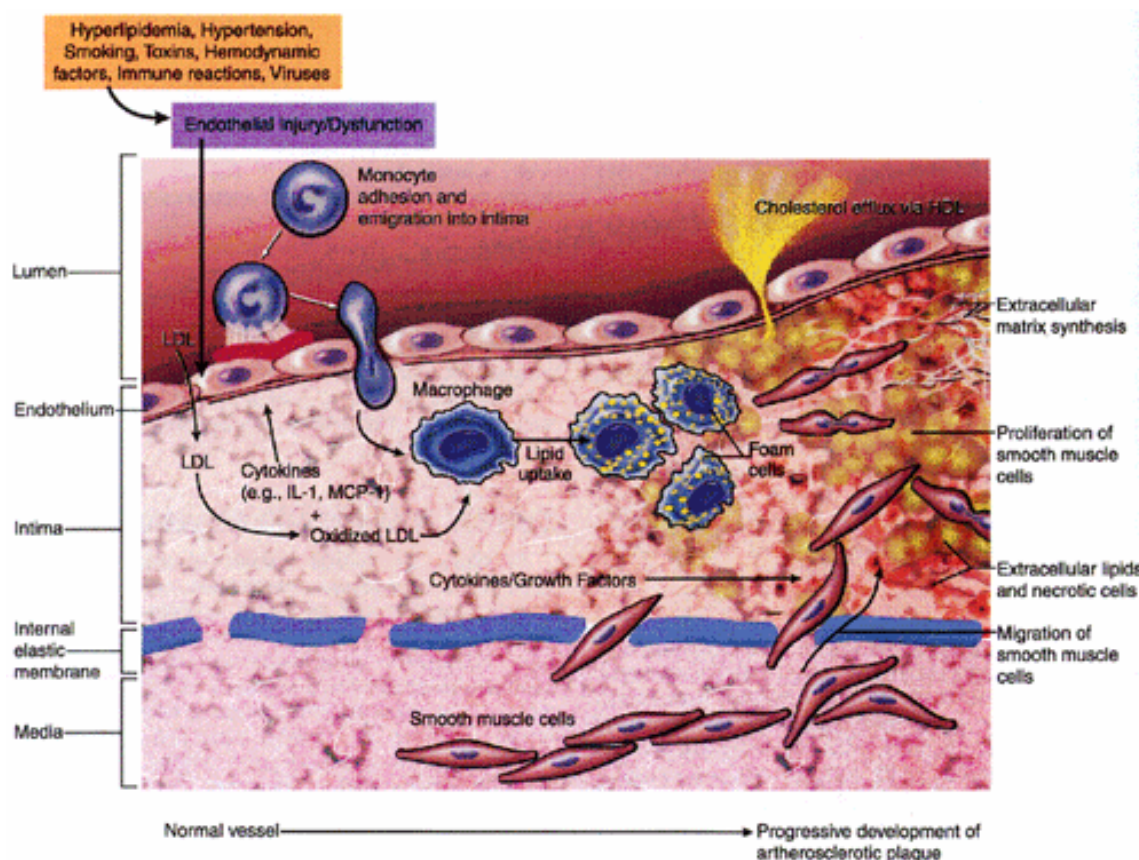
	Plazmatická koncentrácia mmol/l
Celkový cholesterol	<5
LDL-cholesterol	<3
HDL-cholesterol	>1
Triacylglyceroly	<1,7

#### 1.4.2 Endotelová dysfunkcia v patogenéze aterosklerózy

Ox-LDL zohráva dôležitú rolu v počiatočných štádiách aterosklerózy. Makrofágy hromadiace sa na poškodenom endotele sú atrahované ox-LDL-časticami do intimy. Makrofágy prestupujú endotelom a fagocytujú ox-LDL. V ich cytoplazme sa nadmerne hromadia lipidy – vznikajú penové bunky. Aktivované makrofágy produkujú cytokíny (TNF- $\alpha$ , IL-1), rastové faktory (PDGF, VEGF, TGF- $\beta$ ) a oxidačné metabolity (7) (13). Na ich povrchu stúpa počet receptorov pre modifikované LDL-častice. Nasleduje vystupňovaný prechod LDL a o to prudší vznik penových buniek. Pod vplyvom rastových faktorov a cytokínov cez laminu elasticu internu migrujú aj bunky hladkej svaloviny a následne proliferujú. A proces aktivácie endotelu a ďalších monocytov, produkcie rastových faktorov a cytokínov, proliferácie buniek hladkej svaloviny napreduje ďalej, tentoraz už aj so zapojením penových buniek. Vznikajú aterosklerotické lézie. T limfocyty môžu podporovať rozvoj tukových prúžkov a aterosklerotických plátov. Svalové bunky produkujú proteoglykánové molekuly s obsahom kolagénu. Periodicky sa striedajú reparačné a deštruktívne procesy. Plát sa zväčšuje, akumulujú sa lipidy aj vo forme kvapôčiek tuku, pribúda väziva, intima hrubne (7).

## Obrázok č. 8: Patogenéza aterosklerotického plátu

[http://www.medicine.unige.ch/recherche/groupes/b\\_donnees/sujet\\_591\\_1.html](http://www.medicine.unige.ch/recherche/groupes/b_donnees/sujet_591_1.html) (25.2.2015)



### 1.4.3 Fázy aterosklerózy

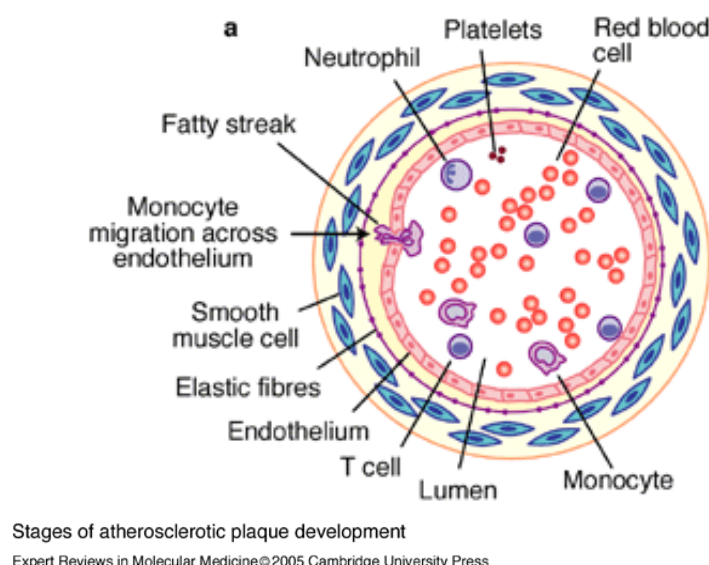
Najprv sa prejaví ako tukové prúžky, tie sa vyvinú do podoby fibróznych a aterómových plátov a celý proces vyúsťuje štádiom komplikácií.

#### 1. Tukové prúžky

Tukové prúžky sú najskoršou identifikovateľnou morfológickou zmenou. Nie sú žiadnou zvláštnosťou už v detskom veku, niekedy sa vyskytujú už aj u novorodencov ako žltý prúžok v intime veľkých ciev. Do lumenu zasahujú iba minimálne, takže markantne neovplyvnia prievit ciev. Tvoria ich penové bunky vzniknuté buď z makrofágov, alebo svalových buniek, a T lymfocyty. V tomto štádiu je ešte možné potlačiť ich existenciu (4).

## Obrázok č.9 a: Tukový prúžok

[http://journals.cambridge.org/fulltext\\_content/ERM/ERM7\\_07/S1462399405009154sup003.htm](http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM7_07/S1462399405009154sup003.htm)  
(1.3.2015)

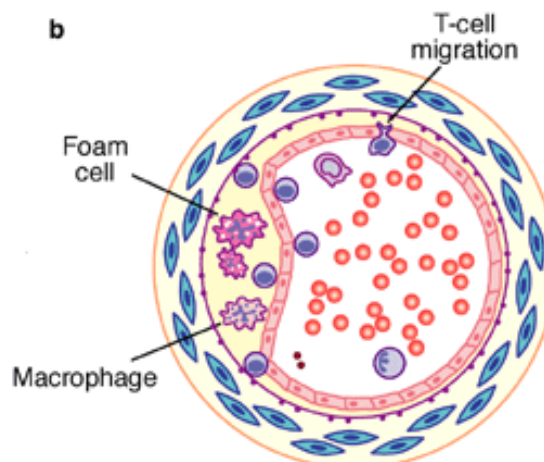


## 2. Fibrózne pláty

Inak nazývané aterómy sú tuhšie, s jasne definovanými okrajmi, bledo šedej, poprípade žltej farby, v závislosti od množstva tukov. Zasahujú do lumenu cievy. Typické sú pre ne proliferujúce bunky hladkej svaloviny, makrofágy meniace sa na penové bunky, lymfocyty, kolagény matrix a voľné lipidy. Hrubšie pláty sú postihované nekrózou, často nasledovanou kalcifikáciou a prestúpením plátu kryštálmi cholesterolu (4).

## Obrázok č.9 b: Fibrózny plát

[http://journals.cambridge.org/fulltext\\_content/ERM/ERM7\\_07/S1462399405009154sup003.htm](http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM7_07/S1462399405009154sup003.htm)  
(1.3.2015)

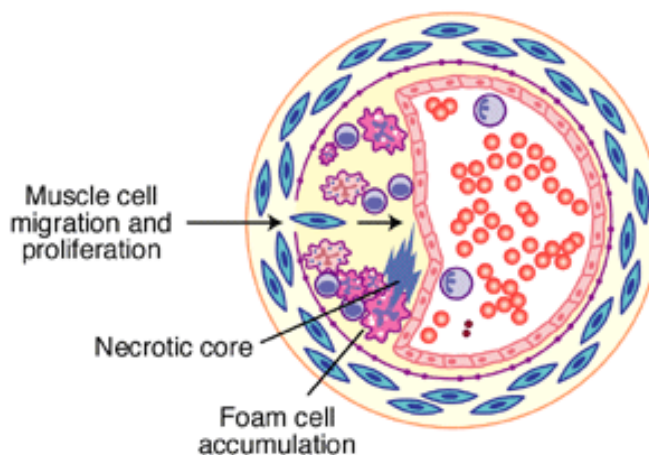


### 3. Štádium komplikácií

Masívna kalcifikácia a degeneratívne zmeny, ako ulcerácie a ruptúry, sú predpokladom vzniku komplikovaných lézií. Sú náchylnejšie na vznik trombu, ktorý je schopný kompletne upchať lumen a znemožniť krvný prietok (4).

#### Obrázok č.9 c: Komplikovaný plát

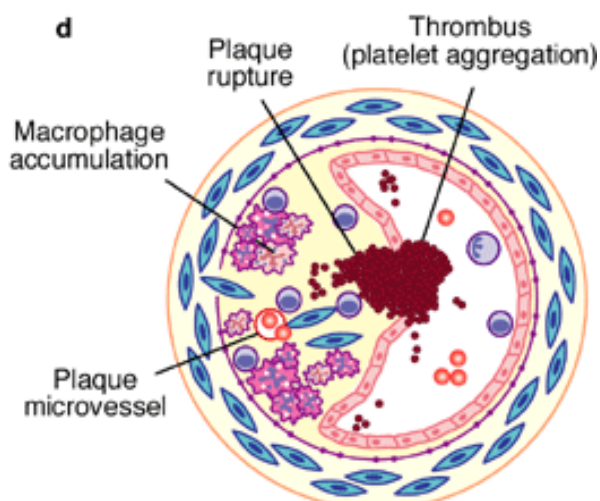
[http://journals.cambridge.org/fulltext\\_content/ERM/ERM7\\_07/S1462399405009154sup003.htm](http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM7_07/S1462399405009154sup003.htm)  
(1.3.2015)



Stages of atherosclerotic plaque development  
Expert Reviews in Molecular Medicine©2005 Cambridge University Press

#### Obrázok č.9 d: Ruptúra plátu

[http://journals.cambridge.org/fulltext\\_content/ERM/ERM7\\_07/S1462399405009154sup003.htm](http://journals.cambridge.org/fulltext_content/ERM/ERM7_07/S1462399405009154sup003.htm)  
(1.3.2015)



Stages of atherosclerotic plaque development  
Expert Reviews in Molecular Medicine©2005 Cambridge University Press

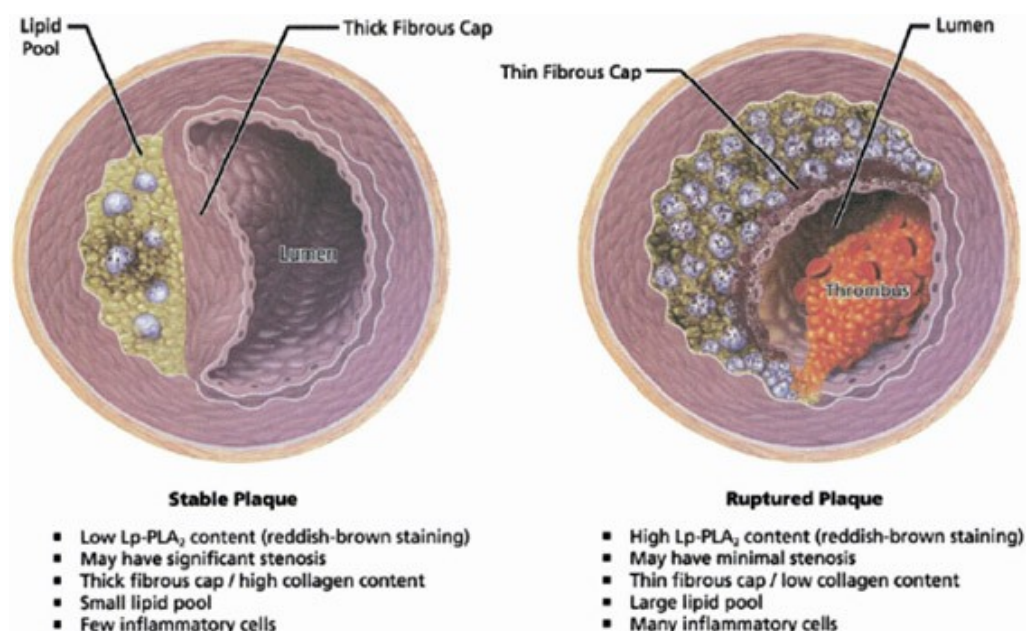


Stabilita plátu určuje jeho náchylnosť k ruptúre a je definovaná hrúbkou fibróznej čiapočky. Vytvorili ju migrujúce a proliferujúce bunky hladkej svaloviny. Apoptóza hladkých svalových buniek a degradácia matrixu vedie k jej stenčeniu.

Plát s veľkým nekrotickým ložiskom, vysokým obsahom zápalových buniek a tenkou fibróznou čiapočkou je nestabilný. Naopak, menšie nekrotické ložisko, menej zápalových buniek a hrubá fibrózna čiapočka charakterizujú stabilný plát. Ruptúra plátu vedie k vzniku trombu, možnému upchatiu cievy s rizikom infarktu myokardu alebo cievnej mozgovej príhody (10).

Obrázok č. 10: Stabilný a nestabilný plát

<http://www.bhinc.com/clinicians/clinical-references/reference-manual/chapter12> (5.3.2015)



## 1.5 Adhézne molekuly

Adhézne molekuly zohrávajú dôležitú úlohu v imunitnej odpovedi organizmu. Jedná sa o heterogénne molekuly umožňujúce prichytenie leukocytov k endotelu a zabezpečujúce potrebnú vzájomnú komunikáciu medzi imunitnými bunkami a endotelom (13) (11). Funkčný endotel síce potláča adhérenciu buniek – vytvára nezmáčavý povrch, leukocyty sa však môžu po povrchu endotelu kotúľať vďaka pôsobeniu bunkovo adhézných molekúl – CAM (cell adhesion molecule). Ide o glykoproteínové adhézne receptory na leukocytoch a protireceptory na endotelových bunkách. Podieľajú sa aj na následnej adhézii a prestupe leukocytov do intimy (7). Modulujú aktiváciu funkcií buniek už adherovaných na endotel. Bez nich by nebola možná extravazácia leukocytov.

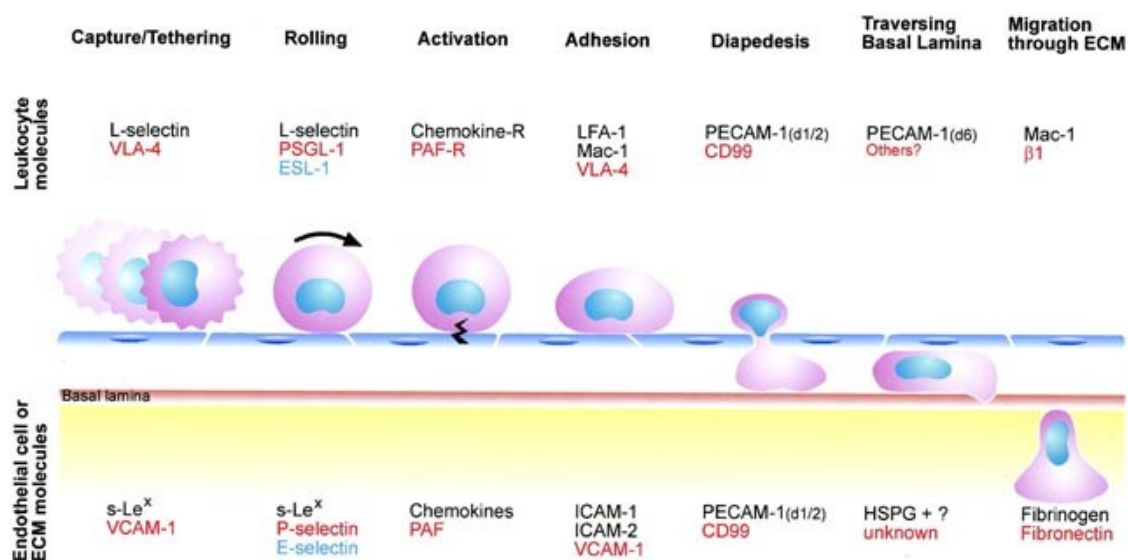
Zohrávajú teda kľúčovú úlohu pri rozvoji zápalovej reakcie organizmu (14). Pôsobením prezápalových cytokínov, oxidantov alebo ox-LDL dochádza k zvýšenej expresii CAM na povrchu endotelových buniek (15) (16).

Transmigrácia leukocyту endotelom:

1. Leukocyty sa kotúľajú po endotele. Vznikajú dočasné interakcie selektínov s ich sacharidovými ligandmi.
2. Zápalové cytokíny TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, chemokíny, komplement C5 aktivujú endotelové bunky a leukocyty k väčšej expresii integrínov ( $\beta_2$ ) a ICAM (intercellular adhesion molecule). Adhézia je sprostredkovaná interakciami integrínov a imunoglobulínových adhézných molekúl.
3. Diapedéza a migrácia do tkaniva prebieha pomocou PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesive molecule 1) (7).
4. Migrácia leukocytov skrz extracelulárnu matrix je ovplyvnená väzbami medzi adhéznymi molekulami na leukocytoch a na molekulách extracelulárneho matrixu (17).

Obrázok č. 11: Prestup leukocyту endotelom

<http://www.nature.com/labinvest/journal/v82/n5/full/3780446a.html> (8.3.2015)



Adhézne molekuly rozdeľujeme do troch skupín: selektíny, integríny a imunoglobulínové adhézne molekuly.

### Selektíny

Jedná sa o povrchové glykoproteíny. Svojim N-terminálnym koncom sa viažu ako lektíny na oligosacharidové štruktúry na endotele alebo na iných leukocytoch (11) (13). Molekuly selektínov zasahujú do lumenu cievy, ich úlohou je spomaliť a zachytiť leukocyty v krvnom toku, majú vplyv na kotúľanie sa leukocytov po povrchu endotelu. IL-1 a TNF- $\alpha$  stimulujú ich produkciu (14) (7).

E-selektín sa nachádza jedine na endotelových bunkách, ktoré sú predom aktivované cytokínmi IL-1 a TNF- $\alpha$ . Jeho oligosacharidové ligandy sú na granulocytoch, monocytoch a časti T lymfocytov.

L-selektín sa nachádza iba na leukocytoch a protireceptory má na endotelových bunkách. Moderuje kotúľanie lymfocytov a neutrofilov, migráciu do zápalového ložiska, ukladanie lymfocytov do periférnych lymfatických uzlín (13) (7). L-selektín zohráva dôležitú rolu v počiatočných štádiách adhézie leukocytov na endotel pri zahájení zápalového procesu. A teda aj v rozvoji aterosklerózy.

P-selektín je uložený v granulách trombocytov (= platelets), nachádza sa aj v endotelových bunkách. Iba cytokínmi aktivované endotelové bunky majú na svojom povrchu P-selektín. Aktívne sa zapája v počiatočných štádiách prichytenia neutrofilov. Ligandy má spoločné s E-selektínom (7).

### Integríny

Sú membránové glykoproteínové molekuly s dvoma reťazcami  $\alpha$  a  $\beta$ . Podľa  $\beta$  reťazca s rozdeľujú na  $\beta_1$  (VLA - very late antigens), leukocytárne  $\beta_2$  a tzv. cytoadhezíny s reťazcom  $\beta_3$  (13). Časť z nich musí byť najprv aktivovaná, niektoré sú stále vyjadrené. Aktiváciou sa mení ich afinita. Viažu sa na adhézne molekuly z imunoglobulínovej veľkorodiny alebo na medzibunkovú matrix. Integríny prichytávajú lymfocyty k endotelovej výstelke, uplatňujú sa pri ich agregácii a migrácii, ako aj pri fagocytóze a cytotoxicite lymfocytov (11) (14).

$\beta_1$  integríny majú ligandy na molekulách rôznych proteínov extracelulárnej matrix, napr. kolagénu, fibronektínu. Riadia adhéziu trombocytov k extracelulárnej matrix či množstvo leukocytov v oblasti zápalu.  $\beta_2$  integríny sú iba na leukocytoch. Výsledkom ich pôsobenia je väzba leukocytu na endotel.  $\beta_3$  integríny nájdeme podobne ako  $\beta_1$  na trombocytoch, leukocytoch a aj endotelových bunkách. Sprostredkovávajú agregáciu trombocytov (13).



## Imunoglobulínové adhézne molekuly

Obsahujú imunoglobulínovú doménu. Sú protireceptormi integrínov lokalizované aj na povrchu endotelových buniek. Leukocytové integríny sa viažu na ICAM-1 a ICAM-2 (intercellular adhesion molecule). VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule) je na povrchu endotelu, a tak umožňuje väzbu pamäťových T lymfocytov, monocytov a bazofilov cez integrín (11) (13). Expresiu indukujú cytokíny ako IL-1 a TNF- $\alpha$ , selektívne ICAM-1 aktivuje IFN- $\gamma$ . VCAM-1 je indukovaný pôsobením IL-4 a IL-13 (18). PECAM-1 molekuly sú exprimované na leukocytoch a endotelových bunkách a umožňujú vlastný prechod leukocytu pomedzi endotelové bunky - diapedézu (7).

Tabuľka č. 2: Adhézne molekuly regulujúce extravazáciu leukocytu

<http://www.google.st/patents/WO2007021853A2?cl=en> (8.3.2015)

	<b>Adhesion receptor on neutrophils</b>	<b>Counter-receptor on endothelial cells</b>	<b>Implicated in</b>
Selectin interactions	P150sLe <sup>x</sup> (CD15), sLe <sup>x</sup> (CD15s), L-selectin (CD62L)	P-selectin (CD62P), E-selectin (CD62E), GlyCAM-1 and others Neutrophil addressins	Leukocyte rolling, binding to high endothelial venules
Integrin-immunoglobulin superfamily interactions	LFA-1, (CD11a/CDE18), VLA-4, (CD49d/CD29)	ICAM-1 (CD54), ICAM-2 (CD102), VCAM-1 (CD106)	Secondary adhesion (sticking), spreading, homing to inflamed tissue
Immunoglobulin superfamily interactions	PECAM-1 (CD31), HCAM (CD44)	PECAM-1 (CD31)	Potentiating adhesion, transendothelial migration. Receptor binding hyaluronate and other molecules of connective tissue.

## 1.6 Cytokíny

Spolu s adhéznymi molekulami zabezpečujú vzájomnú medzibunkovú komunikáciu. Zatiaľčo účinok adhézných molekúl vyžaduje priamy kontakt bunkových štruktúr, cytokíny pôsobia na krátku vzdialenosť. Jedná sa o neimunoglobulínové nízkomolekulárne polypeptidy. Ako rozpustné mediátory sa viažu na špecifické receptory a najčastejšie ovplyvňujú imunitné procesy. Ich účinok sa prejaví už vo veľmi malých množstvách (19) (20). Môže byť endokrinný aj parakrinný. Autokrinne sa prejavujú hlavne miestne – v oblasti zápalu. Pôsobenie cytokínov sa navzájom prekrýva a ovplyvňuje, vytvára tzv. cytokínovú sieť. Na vyvolaní želaného efektu sa vždy podieľa viacero cytokínov (21) (22). Môžu pôsobiť aj systémovo v prípade, že ich bolo

vyprodukovaných viac než aktuálne voľných receptorov. Rozdeľujeme ich do viacerých skupín (23).

#### Tumor nekrotizujúce faktory (TNF)

TNF- $\alpha$  tvoria orgánové makrofágy. Má cytotoxický účinok aj na nádorové bunky. Výrazné katabolické účinky sa prejavujú nádorovou kachexiou – označovaný aj kachektín. Inhibuje lipoproteínové lipázy. Je angiogénny (13). Ovplyvňuje NO-syntázu, výsledkom je vzostup koncentrácie superoxidového aniónu a o to pravdepodobnejší rozvoj endotelovej dysfunkcie.

TNF- $\beta$  je protizápalový cytokín. Podieľa sa na reparačných pochodoch, stimuluje angiogenézu, proliferáciu fibroblastov, chemotaxiu monocytov. Inhibuje proliferáciu T a B lymfocytov, tvorbu makrofágových cytokínov (23).

#### Interferony (IFN)

Cytokíny z tejto skupiny majú antivírusové a antiproliferatívne pôsobenie.

IFN- $\alpha$  (leukocytárny) má výrazné protinádorové pôsobenie (antiproliferatívne) a imunomodulačné. Stimuluje cytotoxické lymfocyty, makrofágy a NK bunky.

IFN- $\beta$  (fibroblastový) znižuje tvorbu IFN- $\gamma$  a TNF.

IFN- $\gamma$  silno podporuje fagocytózu makrofágov tvorbou kyslíkových radikálov.

#### Interleukíny

Regulujú zápalový proces. Prezápalovo pôsobia IL-1  $\alpha/\beta$ , IL-6, IL-8. Zápal potláča IL-10 (13) (22).

IL-1 produkujú makrofágy. Podporuje proliferáciu lymfocytov, endotelových buniek, fibroblastov. Je angiogénny – zvyšuje expresiu adhézných molekúl a tvorbu kolagénu.

IL-8 tvoria T lymfocyty, monocyty, fibroblasty a endotelové bunky. Pôsobí chemotakticky na neutrofily.

IL-10 potláča účinky iných cytokínov, aktivitu makrofágov a tvorbu kyslíkových radikálov (13).

#### Kolónie stimulujúce faktory

CSF (colony stimulating factors), teda rastové faktory, napr. pre trombocyty, leukocyty, endotelové bunky (22).

## 1.7 Endoglin

Endoglin (CD 105) je jedným z receptorov pre TGF- $\beta$ , štruktúrne ide o homodimérový transmembránový glykoproteín s molekulovou hmotnosťou 180kDa. Nachádza sa v membránach endotelových buniek, monocytoch, makrofágoch, bunkách hladkej svaloviny. Zvýšene sa exprimuje na bunkách hladkej svaloviny a na aktivovaných endotelových bunkách ako odpoveď na poškodenia cievnej steny spôsobené aterogenickými rizikovými faktormi (24) (25). Vyskytuje sa v dvoch izoformách, ako častejšie zastúpený L-endoglin (long-form) podporujúci angiogénu a antiangiogenný S-endoglin (short-form). S-endoglin znižuje expresiu endotelovej NO-syntázy a prispieva k rozvoju kardiovaskulárnych porúch (26).

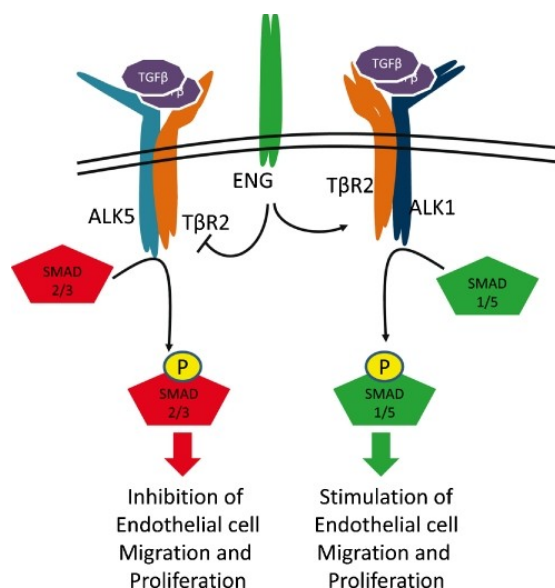
### 1.7.1 TGF- $\beta$ signalizačná dráha

TGF- $\beta$  reguluje bunkovú proliferáciu, diferenciáciu, migráciu, ovplyvňuje karcinogénu, hojenie rán a imunitné procesy. V léziách cievnej steny bola zistená zvýšená koncentrácia TGF- $\beta_1$  (27) (28). Inhibíciou aktivity TGF- $\beta_1$  sa rozvinie v myších modeloch ateroskleróza (29). Neutralizáciou anti-TGF- $\beta_1$  protilátkami dochádza k imunitnej reakcii cievnej steny a zvyšujúcej sa nestabilite plátu (30).

TGF- $\beta$  sa viaže na komplex dvoch transmembránových receptorov - TGF- $\beta$  typu I a II. TGF- $\beta$  receptor typu II má serín/threonín kinázovú aktivitu a fosforyluje receptor typu I. Rozlišujeme 7 typov receptoru typu I (ALK 1 – ALK 7) a 5 typov receptoru II. Kombinácie receptorov typu I a II môžu byť rôzne – viažu sa na ne rozdielne ligandy a zabezpečujú tak špecifitu signalizácie (31). V ďalšom kroku sú fosforylované transkripčné faktory Smad, ktoré následne regulujú transkripciu cieľového génu v jadre (32). Pri regulácii endotelových funkcií sa najviac uplatňujú ALK 1 a ALK 5, Smad2 a 3 s inhibičnými účinkami a Smad1 a 5, naopak s aktivačnými (33) (34). Aký z účinkov TGF- $\beta$  sa prejaví závisí na tom, aký Smad komplex je aktivovaný. Kaskáda je ovplyvnená ďalšími prídavnými receptormi a to receptorom TGF- $\beta$  typ III, čo je v cievach hlavne endoglin (35) (36). Betaglykan je druhý receptor typu III, nie je však exprimovaný v bunkách veľkých ciev a jeho rola v rozvoji aterosklerózy nie je taká podstatná ako endoglinu (36).

Obrázok č. 12: TGF- $\beta$  signalizačná dráha

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3250609/> (12.3.2015)

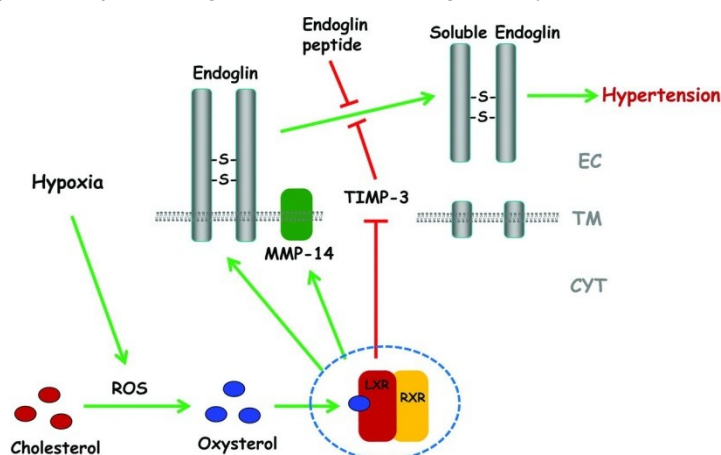


### 1.7.2 Solubilný endoglin

Endoglin môže byť uvoľňovaný z bunkovej membrány do krvi ako solubilný endoglin (sCD105). Jeho zvýšené plazmatické koncentrácie sa dajú použiť ako marker endotelovej aktivácie či poškodenia (24). Boli preukázané pri rôznych patologických stavoch kardiovaskulárneho systému (preeklampsia (37), ateroskleróza (38) (39), hypercholesterolémia (40), hypertenzia), ale aj pri diabete mellite (41). Solubilný endoglin vzniká odštiepením NH<sub>2</sub>-terminálneho konca membránového endoglinu matrixovou metalloproteinázou (MMP-14) (37).

Obrázok č. 13: Solubilný endoglin

<http://circ.ahajournals.org/content/126/22/2612.figures-only> 12.3.2015



*Hypoxia indukuje vznik voľných radikálov, ktoré oxidujú cholesterol. Naviazanie oxidovanej formy na špecifické jadrové receptory (LXR a RXR) vedie k zvýšeniu aktivity MMP-14 a odštiepovaniu solubilného endoglinu.*

Štúdie na myších modeloch preukázali, že solubilný endoglin zvyšuje expresiu adhézných molekúl (VCAM1, P-selektín, solubilný E-selektín), počty po endotele sa kotúlajúcich leukocytov a narúša od endotelu závislé cievne funkcie. Dokáže modulovať TGF- $\beta$  sprostredkovanú signalizáciu (42). Inhibuje naviazanie TGF- $\beta$  na receptorový komplex, a tým následne znižuje aktiváciu endotelovej NO-syntázy. Naviazanie solubilného endoglinu môže ovplyvniť Smad1/5 kaskádu a zmeniť endotelovú funkčnosť. Okrem toho zvyšuje vaskulárnu permeabilitu (37) (43). Má antiangiogénne vlastnosti a po podaní myšiam sa zvyšuje arteriálny tlak (44). Hladiny sú zvýšené u pacientov s hypercholesterolémiou a korelujú s hladinami cholesterolu. Takisto pacienti s nestabilnými plátmi alebo po ruptúre majú zvýšené hladiny solubilného endoglinu v porovnaní s pacientmi so stabilným plátom (38) (45). Napriek tomu sa na myších modeloch potvrdilo, že iba zvýšením plazmatickej hladiny solubilného endoglinu sa neovplyvní expresia membránového endoglinu, adhézných molekúl, či endotelovej NO-syntázy. To však nevylučuje, aby solubilný endoglin spolu s hypercholesterolémiou, prípadne zápalovým procesom neprispieval k zmene endotelových funkcií (46).

## **1.8 Myšie modely aterosklerózy**

Zvieracie modely sa vo výskume používajú pre možnosť plne kontrolovať prostredie a diétu počas experimentu, prípustné šľachtenie a genetické inžinierstvo. Myši sú najširšie používaným modelovým organizmom ľudskej aterosklerózy. Pomerne jednoducho sa získavajú a chovajú, ich genóm je dobre preskúmaný, sú cenovo dostupné. Krátky reprodukčný cyklus a vysoký počet mláďat z jedného vrhu znamená, že je nenáročné vyšľachtiť dostatočný počet myší, potrebný pre štúdie a zároveň sa ateroskleróza u nich môže rozvinúť v krátkom čase (47) (48).

Ich veľkosť zase stanovuje hranice pre získavanie dostatočného množstva vzoriek k popisu lézií a vykonávaniu analýz. Nevýhodou je prevažujúci aterosklerotický typ plátov nad aterotrombotickým a iné pomery krvných lipidov (47) (49).

Geneticky nemodifikované myši (Wild-type) majú v porovnaní s ľuďmi prirodzene vyššie hladiny antiaterogénneho HDL a nižšie hladiny proaterogénnych LDL a VLDL. Prevládajúce protektívne faktory zabraňujú rozvoju aterosklerózy (50). Jedine u myší z kmeňa C57BL/6 kŕmených vysokocholesterolovou diétou s cholínovou kyselinou sa manifestujú pláty. Líšia sa však od ľudských lokalizáciou, histologickou štruktúrou a sú veľmi malé (51). Pridaním transgénov do myšieho genómu je možné doceliť vymazanie (“knockout”) apoE alebo LDL-receptoru, a tak dopomôcť rozvoju lézií (52).

### 1.8.1 ApoE deficientný model

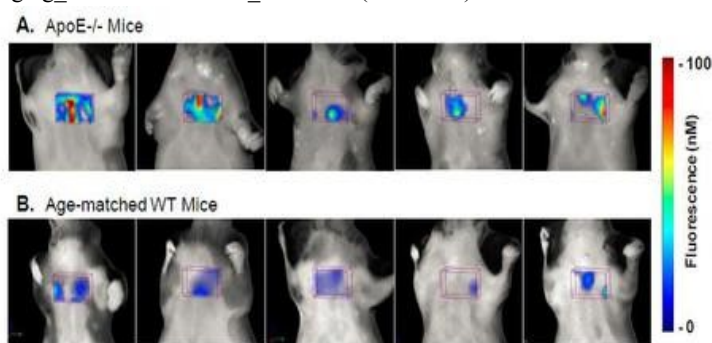
ApoE je glykoproteín syntetizovaný v pečeni aj makrofágoch. Je štruktúrnou súčasťou lipoproteínových častíc. Funguje ako ligand s vysokou afinitou pre apoB, apoE, LDL-receptor a chylomikronový receptor a zabezpečuje vychytávanie častíc obsahujúcich apoE v pečeni. Knockout apoE spôsobí zvýšenie plazmatickej koncentrácie cholesterolu z pôvodných 2 mmol/l na 11mmol/l a rozvoj lézií v oblasti aortálneho kmeňa (52). ApoE má totiž viaceré antiaterogénne vlastnosti aj okrem ovplyvňovania lipidového vychytávania. Inhibuje agregáciu trombocytov, má antioxidačné vlastnosti a pôsobí proti vzniku penových buniek (53). Spontánne sa tvoria aterosklerotické lézie aj pri štandardnej CHOW diéte (nízky obsah tukov a bez obsahu cholesterolu). Pláty sa podobajú ľudským a kompletne sa rozvíjajú od štádia tukových prúžkov až ku komplexným léziám. Proces sa dá podstatne urýchliť diétou s vysokým obsahom tukov aj cholesterolu. Jedná sa o najrozšírenejšie používaný kmeň (54).

### 1.8.2 LDL-receptor deficientný model

Mutácia génu pre LDL receptor u ľudí spôsobí familiárnu hypercholesterolémiu. U myši kŕmených typickou CHOW diétou vedie k zvýšeniu hladiny cholesterolu, 5 mmol/l v porovnaní s 2 mmol/l wild-type myši a len pomalý rozvoj aterosklerózy. Po prechode na diétu s vysokým obsahom tukov a cholesterolu (Western type diet) je rozvoj ochorenia progresívnejší a hladina cholesterolu stúpa nad 25mmol/l. Zložením plazmatických lipoproteínov sa približuje k ľudskému s hlavným podielom LDL frakcie (55). Morfologicky sú lézie porovnateľné s apoE myšami, ale myši s knockoutovaným LDL-receptorom predstavujú vhodnejší model ľudskej aterosklerózy kvôli podobnejšiemu zloženiu plazmatického lipoproteínového profilu (56) (57).

Obrázok č. 14: Porovnanie rozvoja plátu u apoE deficientného a wild type kmeňa pri rovnakých podmienkach a strave

[http://www.perkinelmer.com/resources/technicalresources/applicationsupportknowledgebase/in\\_vivo\\_preclinical\\_imaging\\_ask/atherosclerosis\\_ask.xhtml](http://www.perkinelmer.com/resources/technicalresources/applicationsupportknowledgebase/in_vivo_preclinical_imaging_ask/atherosclerosis_ask.xhtml) (17.3.2015)



## 1.9 Imunohistochemia

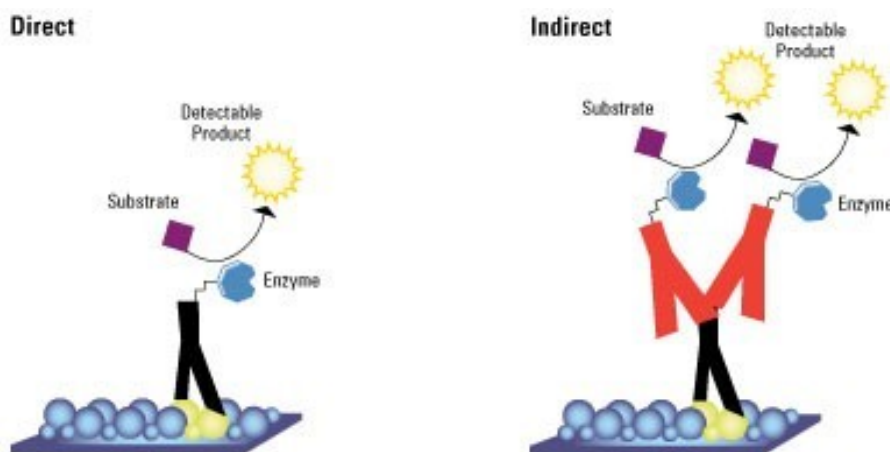
Imunohistochemická analýza je založená na princípe reakcie medzi antigénom a jeho protilátkou. Je široko využívanou metódou vďaka svojej vysokej špecifite a citlivosti (58). Aby mohli byť protilátky pozorované svetelným mikroskopom, musia byť „zviditeľnené“ (59). Na to sa využívajú protilátky s naviazaným enzýmom alebo fluoroforom (fluorescenčnou farbou). Pri detekcii cieľovej štruktúry sa použije substrát, ktorý reaguje s enzýmom na naviazanej protilátke za vzniku farebnej reakcie. V prípade protilátky fluoroform značenej sa prejaví fluorescencia hľadanej štruktúry (60).

### 1.9.1 Priama metóda

Využíva označenú protilátku, ktorá sa naviaže na skúmanú štruktúru. Keďže sa používa iba jedna protilátka, metóda je rýchla a vhodná pre krehké tkanivá, ktoré by mohlo viacnásobné oplachovanie a aplikovanie protilátky poškodiť. Ide o vysoko špecifickú metódu, hoci jej citlivosť je v porovnaní s nepriamymi metódami relatívne nízka. Detekovateľnosť je limitovaná a je potrebná vysoká koncentrácia protilátky (58).

Obrázok č. 15: Priama a nepriama metóda

<https://www.lifetechnologies.com/sk/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/ihc-immunodetection.html> (22. 3.2015)



### 1.9.2 Nepriame metódy

V porovnaní s priamou metódou sú citlivejšie.

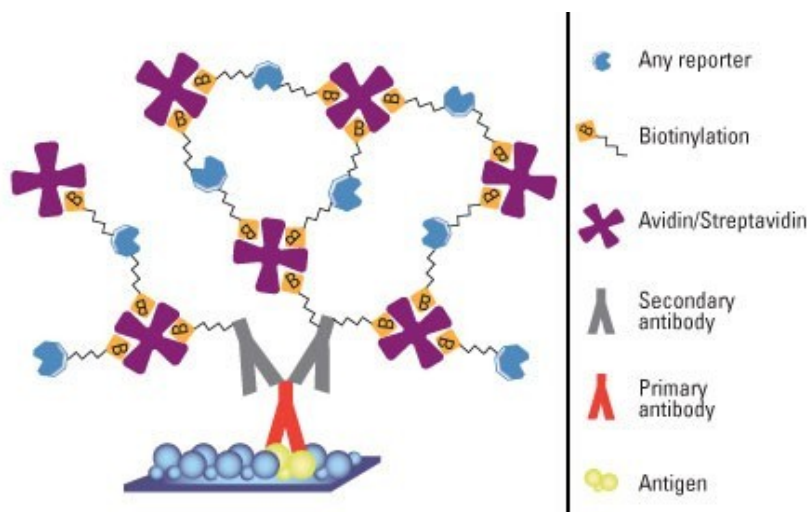
Dvojstupňová metóda využíva neznačenú primárnu protilátku, na ktorú sa v druhom kroku naviaže sekundárna protilátka s naviazaným enzýmom alebo fluoroforom (60). Sekundárna protilátka je protilátkou proti druhu zvierat'a, z ktorého

bola získaná primárna. Jedná sa o efektívnejšiu metódu, keďže sa signál amplifikuje. Na jednu primárnu protilátku sa môžu naviazať dve sekundárne, a tak zosilniť signál. Množstvo primárnej protilátky je dostačujúce aj v desaťkrát väčšom zriedení než pri priamej metóde. Je náročnejšia na prevedenie a aj časovo. Použitím dvojice protilátok sa síce zvyšuje riziko neželanej reakcie, aplikácia neimúnneho séra však blokuje tieto reakcie.

Trojstupňová metóda zaručuje špecifickejšiu a intenzívnejšiu reakciu a ešte väčšiu detektabilitu. Používa sa neoznačená primárna protilátka (napr. rabbit anti-Ag) a neoznačená sekundárna (goat anti-rabbit Ig) (58). Sekundárna protilátka tvorí akýsi spojovací mostík, na ktorý sa v treťom kroku naviaže napr. peroxidáza-anti-peroxidázový komplex obsahujúci protilátky získané z rovnakého zvierat'a ako je primárna (rabbit) (59). K trojstupňovým nepriamym metódam patrí aj avidín-biotín komplex (ABC). Metóda je založená na vysokej afinite streptavidínu, získaného zo *Streptomyces avidinii*, a avidínu zo slepačieho vajička k biotínu. Väzba medzi nimi je veľmi silná, nekovalentná a púta jednu molekulu avidínu k štyrom biotínovým. Avidín môže viazať aj negatívne nabitú lektínové ligandy, preto sa často nahrádza streptavidínom (61). Biotín je naviazaný na sekundárnej protilátke. Tretia vrstva je tvorená komplexom avidín-biotín-enzým (napr. peroxidáza). Výhodou je veľmi zreteľný signál spôsobený druhou a treťou vrstvou (60).

Obrázok č. 16: Metóda avidín-biotín komplex

<https://www.lifetechnologies.com/sk/en/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/ihc-immunodetection.html> (22. 3.2015)





## **2      Zadanie diplomovej práce, cieľ práce**

Cieľom tejto diplomovej práce bolo popísať zmeny expresie adhéznej molekuly VCAM-1 a výskyt makrofágov v stene aorty myší s nízkou a vysokou hladinou solubilného endoglínu (Sol-Eng+). Taktiež porovnať expresiu oboch markerov, jednak z hľadiska intenzity a plochy farbenia. Použili sme imunohistochemické metódy s detekciou vo fluorescenčnom mikroskope.

## **3 Experimentálna časť**

### **3.1 Použité zvieratá a ich predpísaná diéta**

Boli použité geneticky modifikované myši s vysokou hladinou ľudského solubilného endoglínu (Sol-Eng+) získané z Univerzity Salamanca v Španielsku. Išlo o šesťmesačné samice z kmeňa CBAxC57BL/6J.

Po dobu troch mesiacov boli kŕmené vysokotukovou diétou s obsahom 1,25% cholesterolu a 40% tuku (Research Diets, Inc, USA). Kontrolná skupina pozostávala z rovnako starých myší, ale s nízkou hladinou solubilného endoglínu. Myši boli chované v priestoroch so stálou teplotou, vlhkosťou, voľným prístupom k pitnej vode a dvanásťhodinovým svetelným režimom.

Všetky experimenty prebehli v súlade so smernicami Európskej únie o chove a liečbe zvierat. Protokoly boli schválené Etickou komisiou na ochranu zvierat proti týraniu na Farmaceutickej fakulte Karlovej univerzity v Prahe. Všetky operačné zákroky boli vykonané pod ketamínovou/xylazínovou anestéziou. Vyvinulo sa maximálne úsilie obmedziť utrpenie zvierat.

Vzorky krvi na analýzu boli odobraté z koncovej časti chvosta. Na určenie koncentrácie ľudského endoglínu bolo použité Quantikine ELISA Kit (R&D Systems, MN, USA). Vzorky pre imunohistochemickú analýzu boli získané z descendentnej aorty.

### **3.2 Imunohistochémia**

Imunohistochemická analýza prebehla na tkanive descendentnej aorty, ktoré bolo spracované ponorením do OTC media (Leica, Praha, Česká republika), potom bolo pôsobením tekutého dusíka zmrazené a pri mínus 80°C skladované. Tkanivové rezy boli zhotovované za použitia zmrazovacieho mikrotomu. Zmrazené tkanivo bolo nakrájané za vzniku priečnych rezov hrubých 7 µm. Takto získané rezy boli následne uložené na podložné sklička ošetrené roztokom želatíny. Po oschnutí boli podložné sklička s tkanivovými rezmi najprv na tridsať minút vložené do acetónu pri teplote mínus 20°C, nechali sa oschnúť a potom boli ponorené na 5 minút do pufru - roztoku PBS (phosphate-buffered saline) pripraveného nariadením PBS vodou (1/10). V ďalšom kroku bolo na 30 minút aplikované mlieko Skim Milk Powder for Microbiology (Sigma-Aldrich, USA) rozpustené v roztoku PBS (1/20). Bielkoviny z mlieka sa viažu na bunkové štruktúry,

a tak zabráni nežiaducej väzbe protilátok. Následne boli sklíčka opláchnuté roztokom PBS. Takto boli rezy pripravené na vlastné farbenie.

#### Farbenie makrofágov

V prípade farbenia makrofágov sa pokračovalo hodinovou inkubáciou s primárnou protilátkou Rat Anti-Mouse Macrophages/Monocytes, AbD Serotec nariedenou BSA (bovine serum albumin) v pomere 1/100. Sekundárnou protilátkou bolo Goat anti-rat DyLight488 (Jackson ImmunoResearch, USA) (1/100 v BSA) so zeleným fluorochromom, ktoré sa necháva pôsobiť 30 minút. Potom sa sklíčka vložili dvakrát na dobu 5 minút do roztoku PBS. Na farbenie bunkových jadier bolo použité modro fluoreskujúce DAPI (4',6-diamidin-2-fenylindol) nariedené v PBS 1/5. DAPI sa za 10 minút naviaže na oblasti DNA bohaté na adenín a tymín. Oplachovalo sa roztokom PBS dvakrát po dobu 5 minút a príprava preparátu bola zakončená montážou krycieho sklíčka za použitia montovacieho média DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan).

#### Pracovný protokol farbenia makrofágov – dvojstupňová metóda

- |  |         |
|--|---------|
| 1. PBS                                 | 5 min   |
| 2. Mlieko + opláchnutie                | 30 min  |
| 3. Primárna protilátka rat anti-mouse  | 60 min  |
| 4. PBS                                 | 2x5 min |
| 5. Sekundárna protilátka goat anti-rat | 30 min  |
| 6. PBS                                 | 2x5 min |
| 7. DAPI (1/5 v PBS)                    | 10 min  |
| 8. PBS                                 | 2x5 min |
| 9. Montovanie krycieho sklíčka v DABCO |         |

#### Farbenie VCAM-1

Pri farbení VCAM-1 bola ďalším krokom 30 minútová inkubácia s anti-avidínom (Avidin/Biotin Blockin Kit, Vector Laboratories, USA) k znemožneniu nešpecifického naviazania avidínu. Potom sa sklíčka vložili dvakrát na dobu 5 minút do roztoku PBS. Farbenie VCAM-1 po oplachu v roztoku PBS pokračuje 15 minútovou aplikáciou anti-biotínu (Avidin/Biotin Blockin Kit, Vector Laboratories, USA) s cieľom zamedziť

neželanej väzbe biotínu. Zvyšky anti-biotínu boli zmývané roztokom PBS dvakrát po dobu 5 minút. Primárnou protilátkou anti-VCAM-1 Goat Anti-mouse CD 106, RD Systems, USA nariedenou s BSA (1/50) sa inkubovalo 60 min. Znova sa použil na oplach roztok PBS dvakrát po dobu 5 minút. Inkubácia sekundárnou protilátkou Peroxidase Horse Anti-Goat IgG Antibody (Vector Laboratories, USA) s BSA v pomere 1/400 prebiehala 30 min. Nasleduje oplach roztokom PBS dvakrát po dobu 5 minút a 30 minútová aplikácia streptavidínu (ExtrAvidin®–Cy3™, Sigma-Aldrich, USA) (1/300 v BSA). Po dvojnásobnom 5 minútovom oplachu roztokom PBS sa inkubovalo 10 minút s DABI (1/5 v PBS). Po zmytí zvyškov DABI dvojnásobným 5 minútovým oplachom roztokom PBS sa montuje krycie sklíčko v DABCO.

#### Pracovný protokol farbenia VCAM-1 – ABC metóda

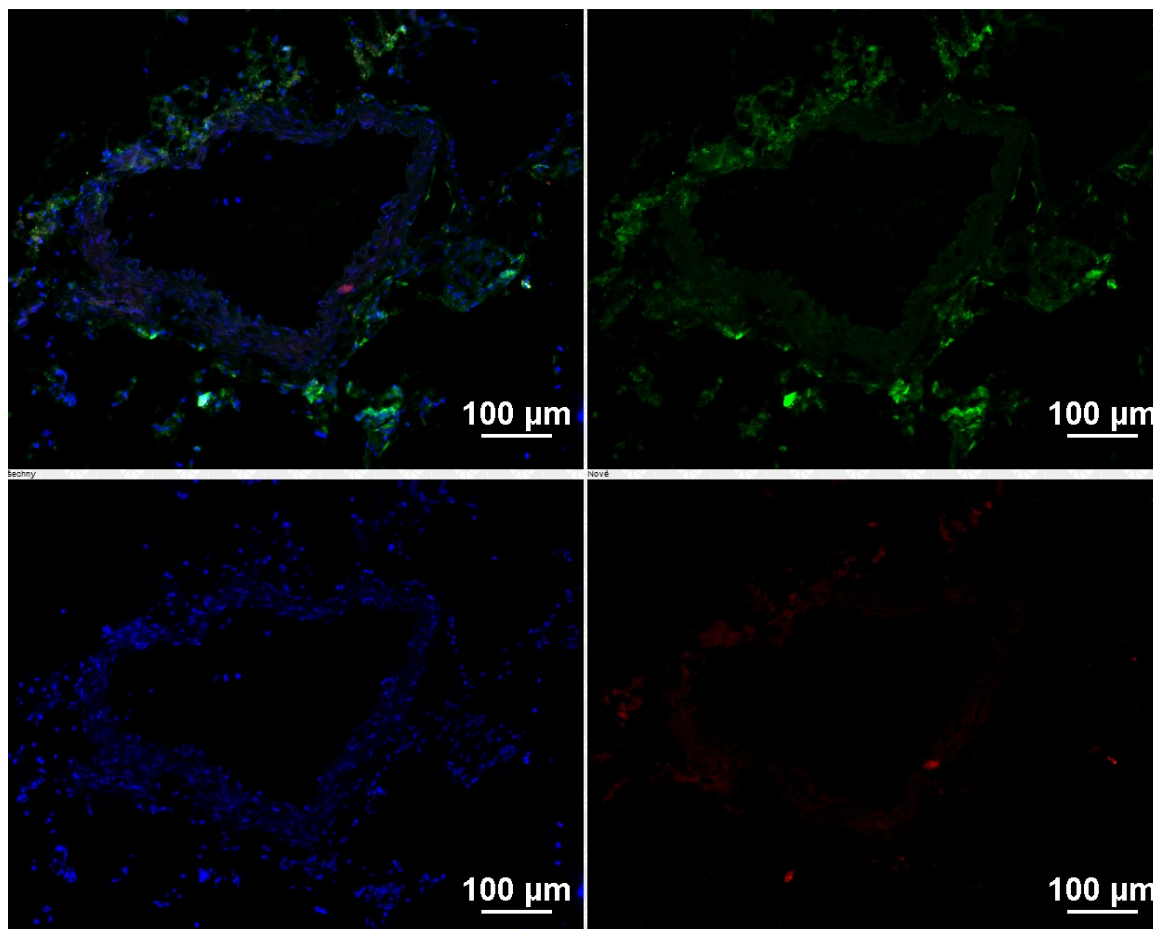
1. PBS	5 min
2. Mlieko + opláchnutie	30 min
3. Anti-avidín	15 min
4. PBS	2x5 min
5. Anti-biotín	15 min
6. PBS	2x5 min
7. Primárna protilátka goat-anti-mouse	60 min
8. PBS	2x5 min
9. Sekundárna protilátka horse-anti-goat	30 min
10. PBS	2x5 min
11. Streptavidín	30 min
12. PBS	2x5 min
13. DAP	10 min
14. PBS	2x5 min
15. Montovanie krycieho sklíčka v DABCO	

### **3.3 Výsledky**

#### **3.3.1 Imunohistochemická analýza výskytu makrofágov**

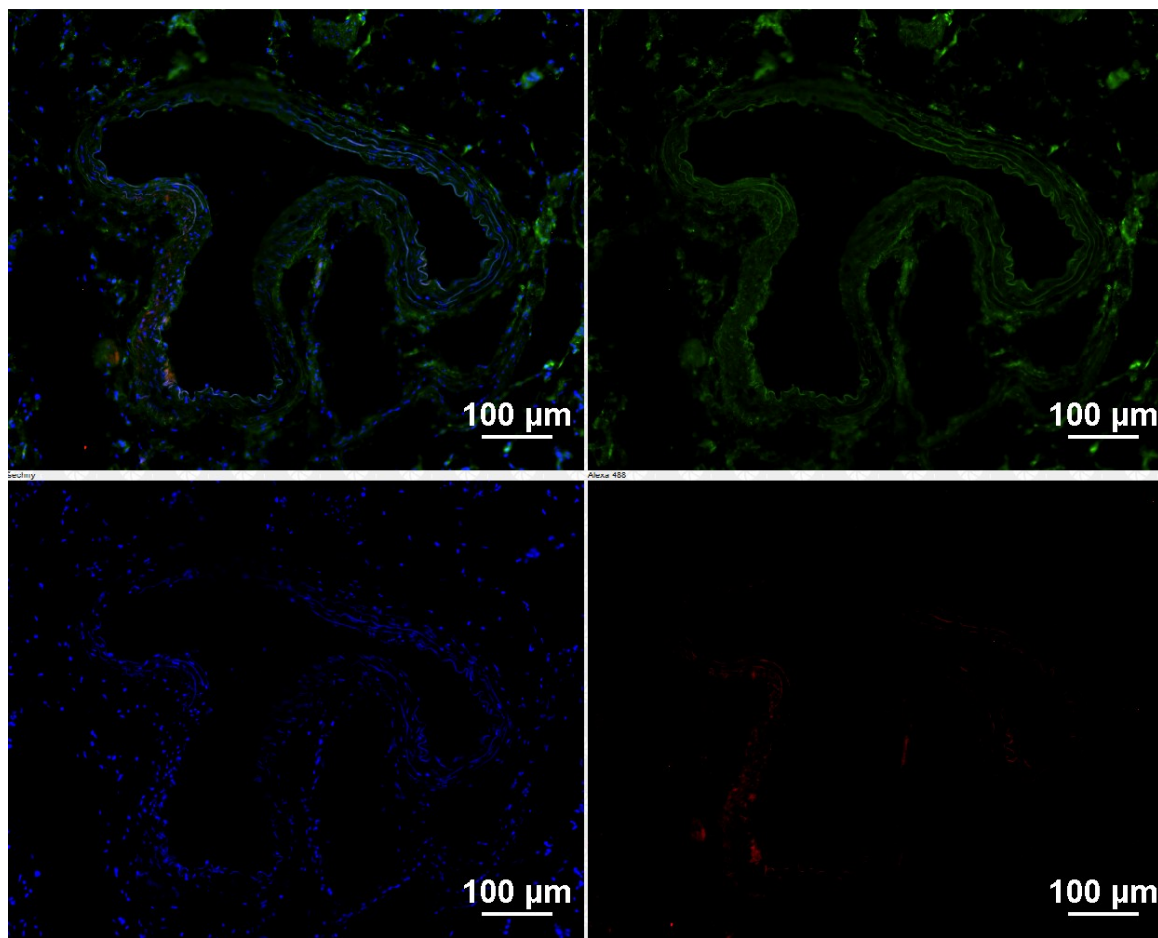
Imunohistochemickou metódou s fluorescenčnou detekciou sa sledoval výskyt makrofágov v descendentnej aorte kontrolnej skupiny a v descendentnej aorte myši Sol-Eng+, pričom obe skupiny boli kŕmené vysokotukovou diétou. Vzorky kontrolnej skupiny nenasvedčovali prítomnosti makrofágov v stene cievy (vid' obr. 17 a 18). Nebol preukázaný ani zvýšený, resp. nejaký výskyt makrofágov v cievach myši Sol-Eng+ (19 a 20). V oboch skupinách sa teda nepreukázala prítomnosť makrofágov a ani aterosklerotických plátov (vid' obr. 17 - 20). Bol použitý myší model bez knockoutovaného génu pre LDL-receptor alebo ApoE, takže sa u neho ateroskleróza nerozvíja.

Obrázok č. 17: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie makrofágov, kontrolná skupina; mierka 100  $\mu$ m.



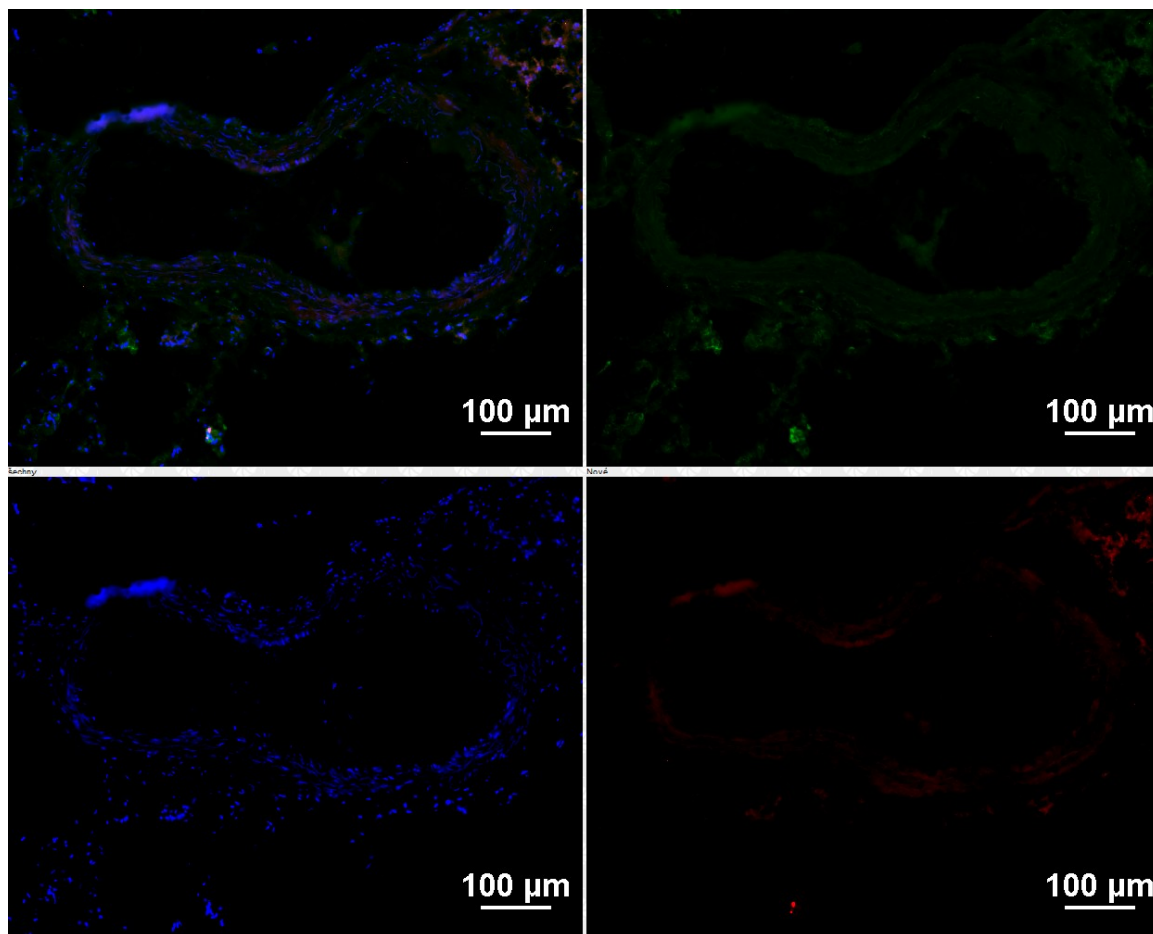
*Zelený kanál predstavuje autofluorescenciu tkaniva. Modrý zobrazuje bunkové jadrá a červený makrofágy. Na obrázku zo zložených kanálov nie je badateľné žiadne osídlenie cievnej steny makrofágmi. V prípade nejasných štruktúr objavujúcich sa na červenom kanáli sa jedná len o autofluorescenciu tkaniva. Elastické blanky uložené v tunica média sú pozorovateľné ako autofluoreskujúce pozdĺžne jemne zvlnené útvary. Vzorky kontrolnej skupiny nenasvedčovali prítomnosti makrofágov ani aterosklerotického plátu.*

Obrázok č. 18: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie makrofágov, kontrolná skupina; mierka 100  $\mu$ m.



*Autofluorescencia tkaniva je zobrazená na zelenom kanáli. Autofluorescenčné elastické blanky média sú dobre viditeľné takisto ako bunkové jadrá (modrý kanál). Na červenom kanáli je badateľná iba autofluorescencia tkaniva, makrofágy nie sú pozorované. Zložený kanál potvrdzuje, že makrofágy a aterosklerotické pláty sa v descendentnej aorte myši kontrolnej skupiny nevyskytujú.*

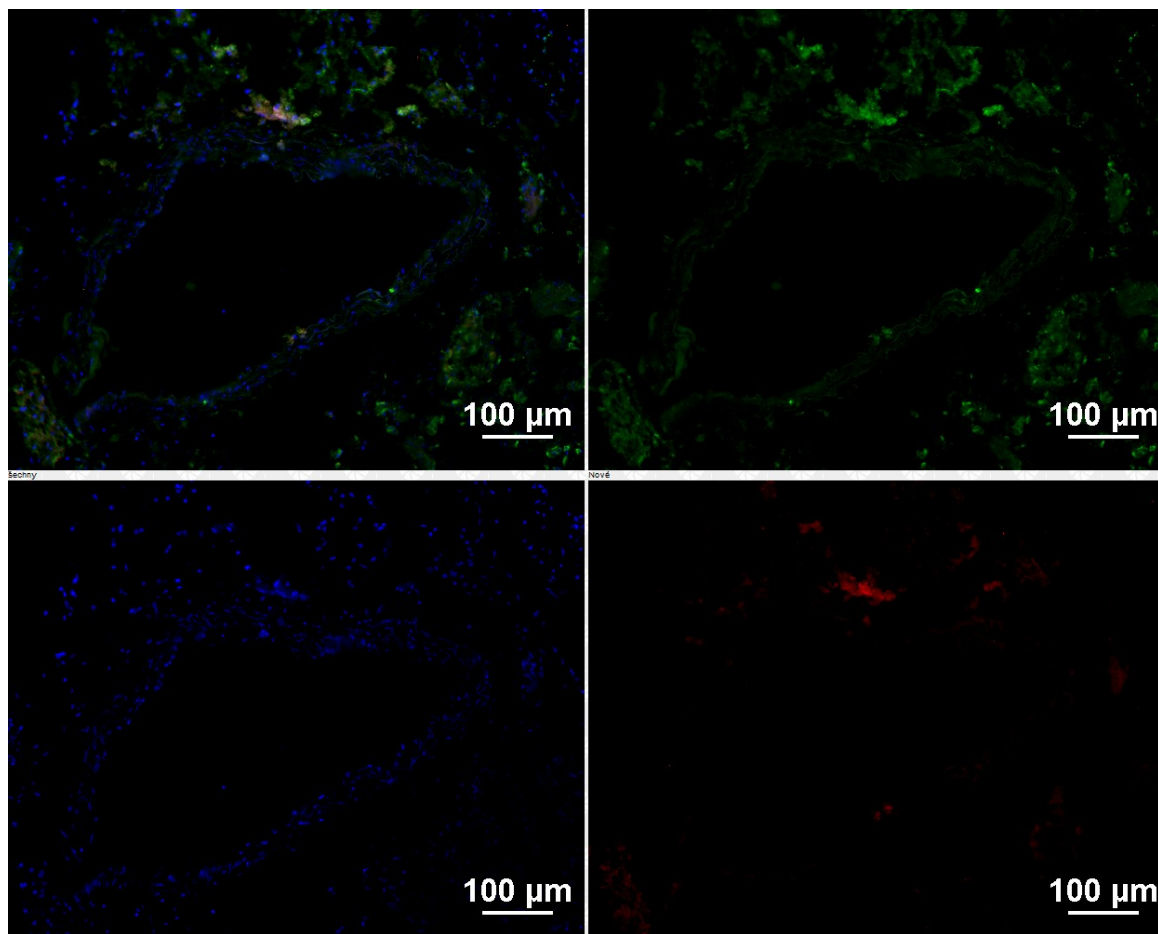
Obrázok č. 19: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie makrofágov, myší model Sol-Eng<sup>+</sup>; mierka 100  $\mu$ m.



*Zelený kanál predstavuje autofluorescenciu tkaniva. Modrý zobrazuje bunkové jadrá a červený makrofágy. Obrázok zo zložených kanálov nepotvrďuje žiadne významné zmeny vo výskyte makrofágov v porovnaní s kontrolnou skupinou. Nepotvrďuje prítomnosť makrofágov v descendantnej aorte myši Sol-Eng<sup>+</sup>. Nebol pozorovaný žiadny aterosklerotický plát.*



Obrázok č. 20: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie makrofágov, myší model Sol-Eng<sup>+</sup>; mierka 100  $\mu$ m.

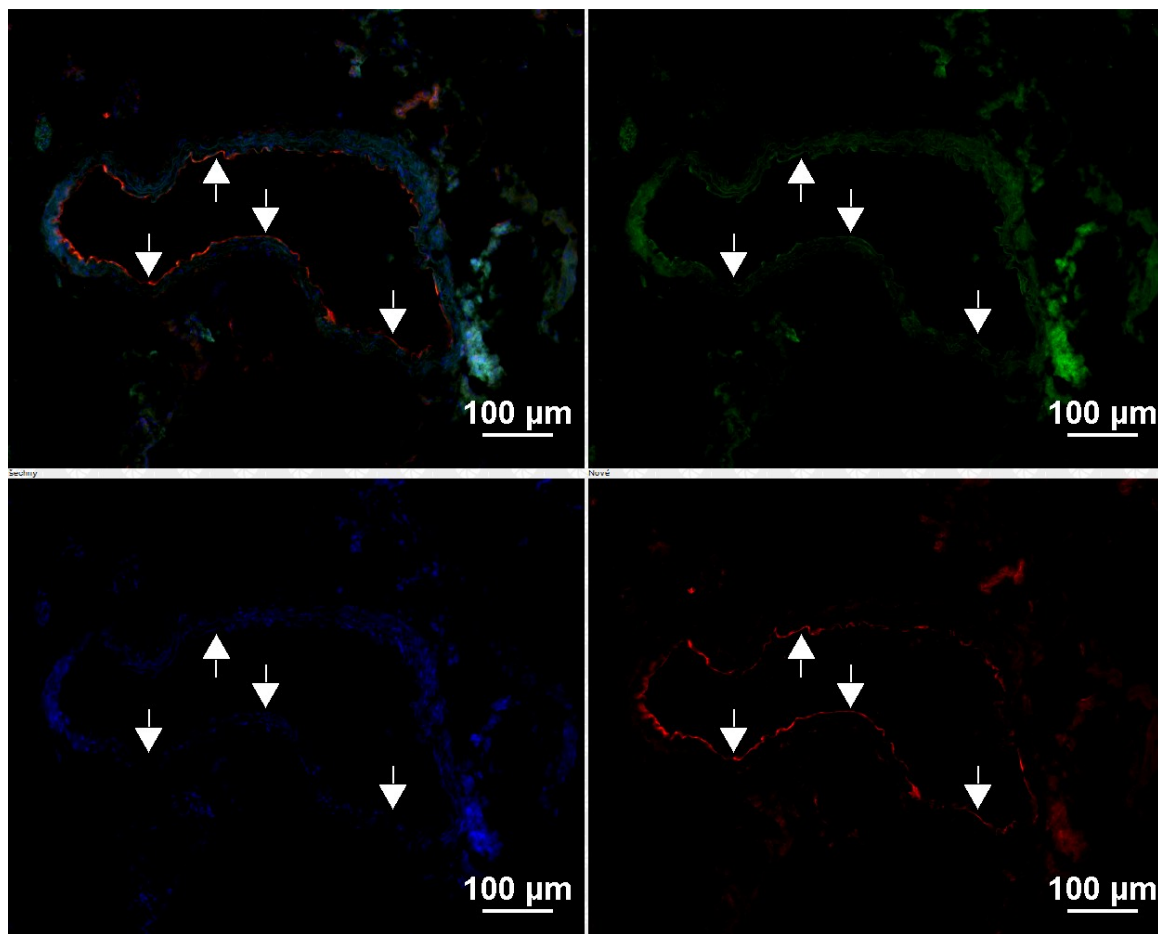


*Zelený kanál predstavuje autofluorescenciu tkaniva. Modrý zobrazuje bunkové jadrá a červený makrofágy. Obrázok zo zložených kanálov nenaznačuje výskyt makrofágov v stene descendentnej aorty myši Sol-Eng<sup>+</sup>. Nepoukazuje na žiadne výrazné rozdiely v počte makrofágov a tvorbe aterosklerotického plátu v porovnaní s kontrolnou skupinou.*

### **3.3.2 Imunohistochemická analýza expresie VCAM-1**

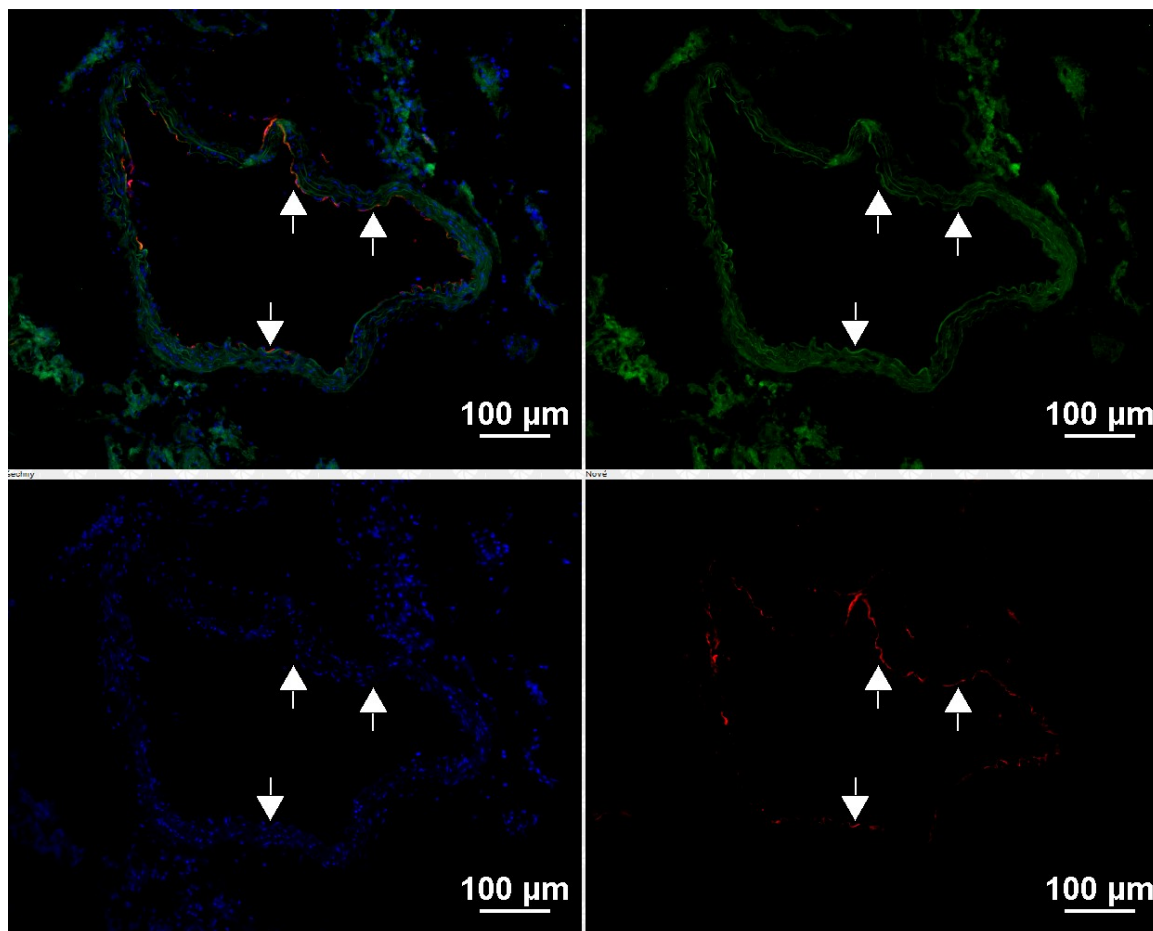
Expresia VCAM-1 v descendentnej aorte kontrolnej skupiny a v descendentnej aorte myší Sol-Eng+ bola pozorovaná imunohistochemickou metódou s fluorescenčnou detekciou. Obe skupiny boli síce kŕmené diétou s vysokým obsahom tukov, ale ateroskleróza sa nerozvinula, pretože išlo o myši bez knockoutovaného génu pre LDL-receptor alebo ApoE. (viď obr. 21 - 26) Vzorky kontrolnej skupiny preukázali expresiu VCAM-1 výhradne na povrchu endotelu ciev (viď obr. 21 - 23). Vznik aterosklerotického plátu ani expresia VCAM-1 v médiu nie sú preukázané. Najvýraznejšie sa prejavila produkcia VCAM-1 v cieve z kontrolnej skupiny (viď obr. 21), kde vytvára súvislú vrstvu na celom endotele. K expresii VCAM-1 došlo aj na endotelových bunkách ciev myší Sol-Eng+ (viď obr. 24 - 26) a to s rovnakou intenzitou aj lokalizáciou – jedine na endotele, tak ako u myší z kontrolnej skupiny. Expresiu teda nemôžeme považovať za rozdielnu medzi oboma skupinami.

Obrázok č. 21: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie VCAM-1, kontrolná skupina  
mierka 100  $\mu\text{m}$ .



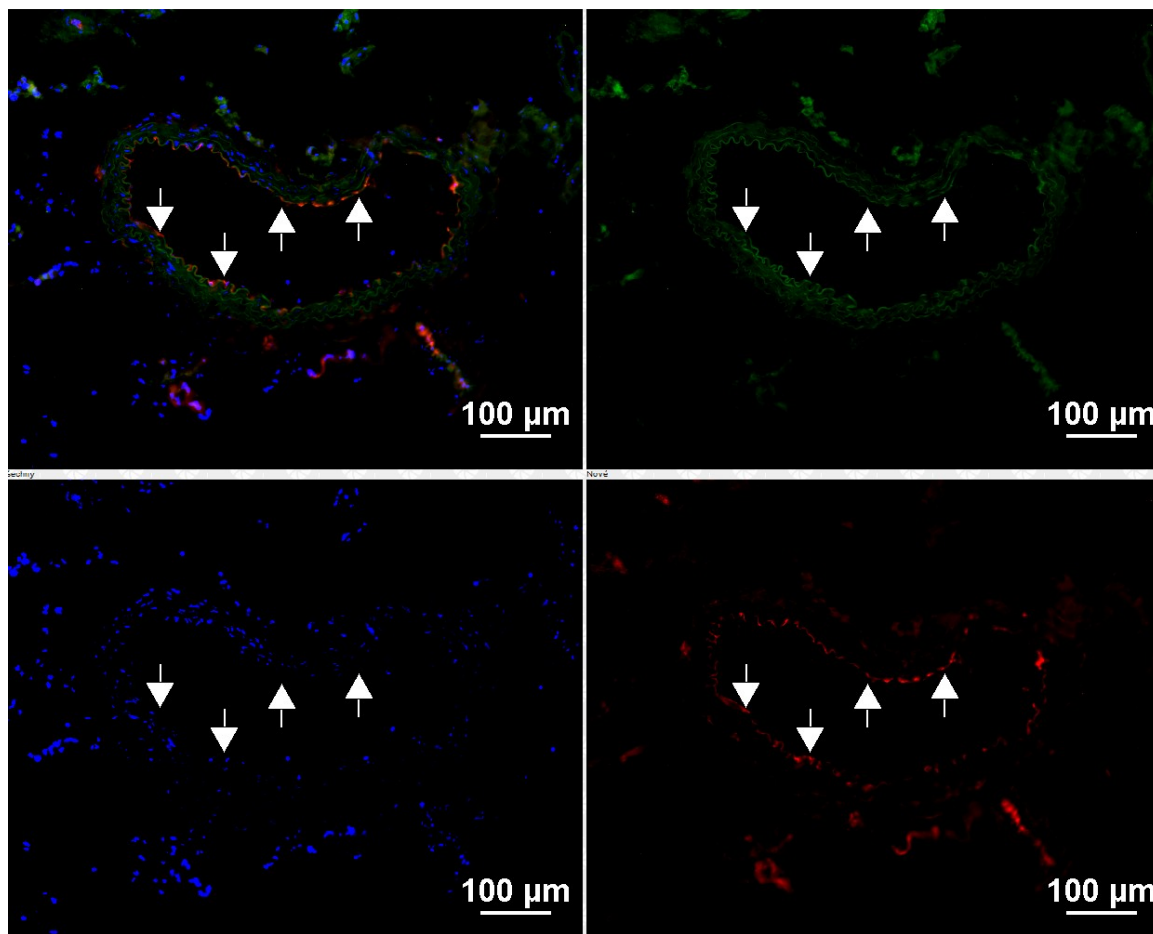
*Zelený kanál predstavuje autofluorescenciu tkaniva. Modrý zobrazuje bunkové jadrá a červený expresiu molekúl VCAM-1. Pozdĺžne uložené jemne zvlnené útvary s autofluorescenciou sú elastické blanky uložené v tunica média. Obrázok zložený zo všetkých kanálov znázorňuje veľmi výraznú expresiu VCAM-1 len na endotele cievy (šípky). K rozvoju aterosklerózy nedošlo.*

Obrázok č. 22: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie VCAM-1, kontrolná skupina; mierka 100  $\mu$ m.



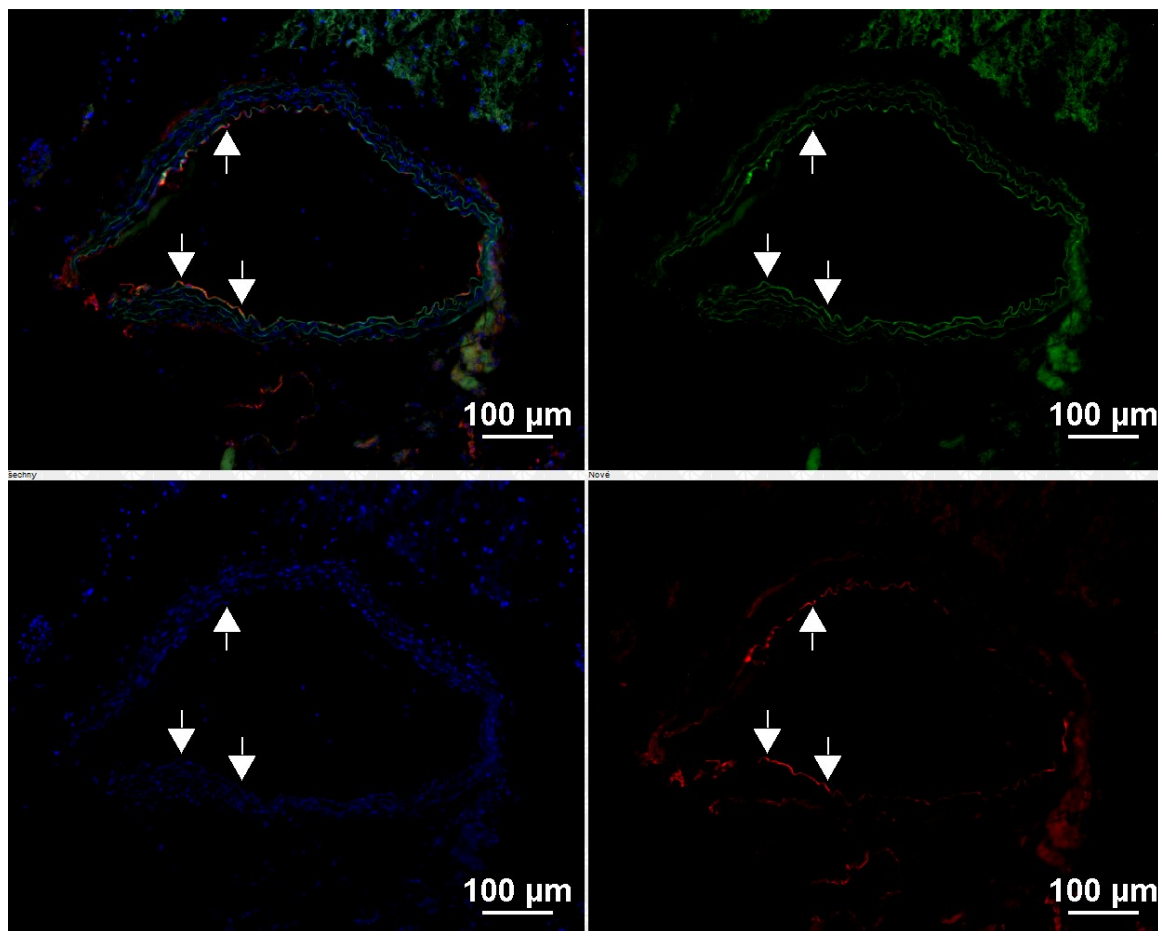
*Autofluorescencia tkaniva je zobrazená na zelenom kanáli. Pozorovateľné sú elastické blanky média s autofluorescenciou. Bunkové jadrá ukazuje modrý kanál a červený kanál expresiu VCAM-1. Obrázok zložený zo všetkých kanálov zobrazuje molekuly VCAM-1 lokalizované len na endotele cievy (šípky), v porovnaní s iným rezom z rovnakej skupiny sice (vid' obr. 21 ) menej výraznú, ale stále porovnateľnú s rezmi descendentnej aorty myši Sol-Eng<sup>+</sup> (vid' obr. 25).*

Obrázok č. 23: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie VCAM-1, kontrolná skupina; mierka 100  $\mu\text{m}$ .



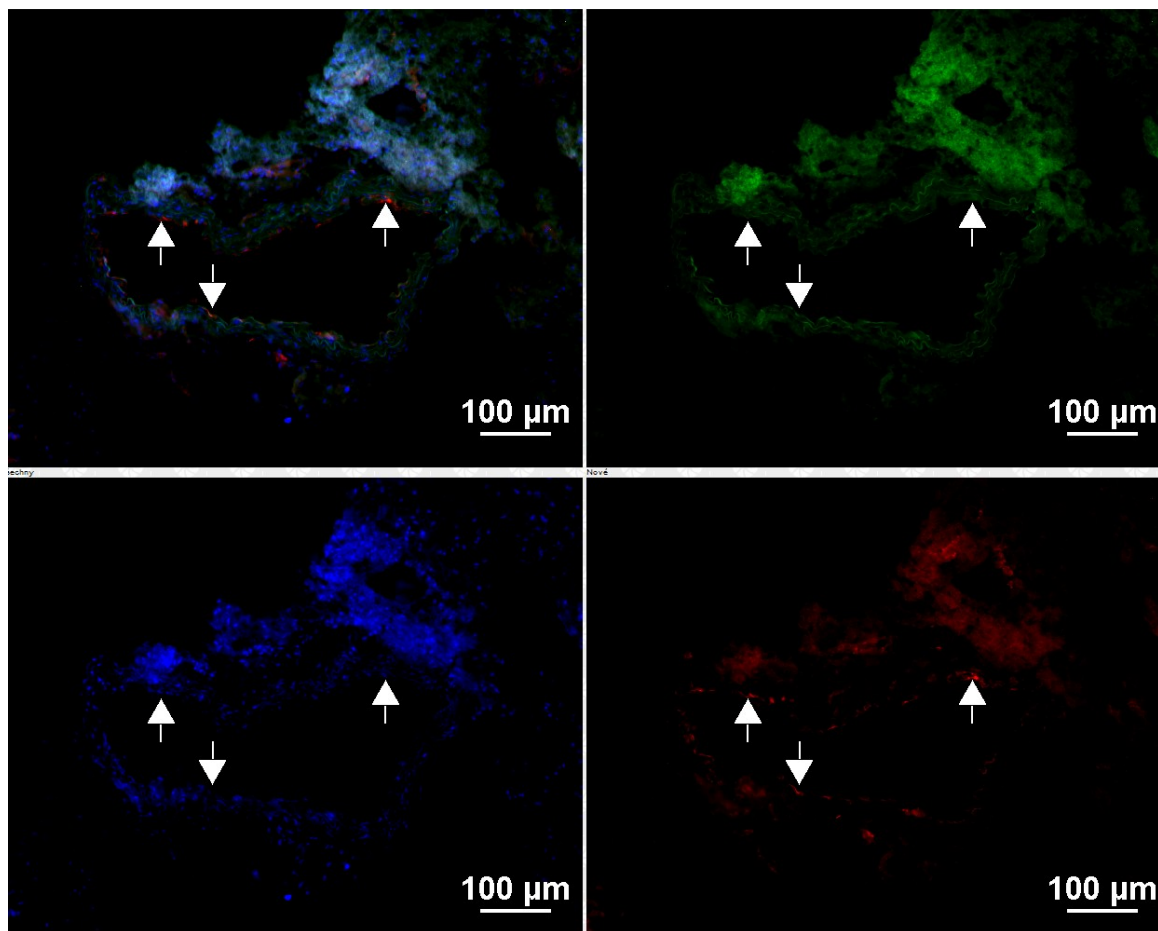
*Zelený kanál predstavuje autofluorescenciu tkaniva. Modrý zobrazuje bunkové jadrá a červený výraznú expresiu molekúl VCAM-1. Obrázok zložený zo všetkých kanálov znázorňuje silnejšiu exprimáciu VCAM-1 na povrchu endotelu cievy (šípky). V médiu k produkcii VCAM-1 nedochádza. Elastické blanky uložené v tunica média sú pozorovateľné ako pozdĺžne jemne zvlnené útvary s autofluorescenciou.*

Obrázok č. 24: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie VCAM-1, myší model Sol-Eng<sup>+</sup>; mierka 100  $\mu$ m.



Zelený kanál predstavuje autofluorescenciu tkaniva. Modrý zobrazuje bunkové jadrá a červený expresiu molekúl VCAM-1. Obrázok zložený zo všetkých kanálov znázorňuje exprimáciu VCAM-1 viazanú na povrch endotelu (šípky). Imunohistochemické farbenie nepreukázalo významne rozdielnu expresiu VCAM-1 v porovnaní s kontrolnou skupinou. (vid' obr. 21 a 23).

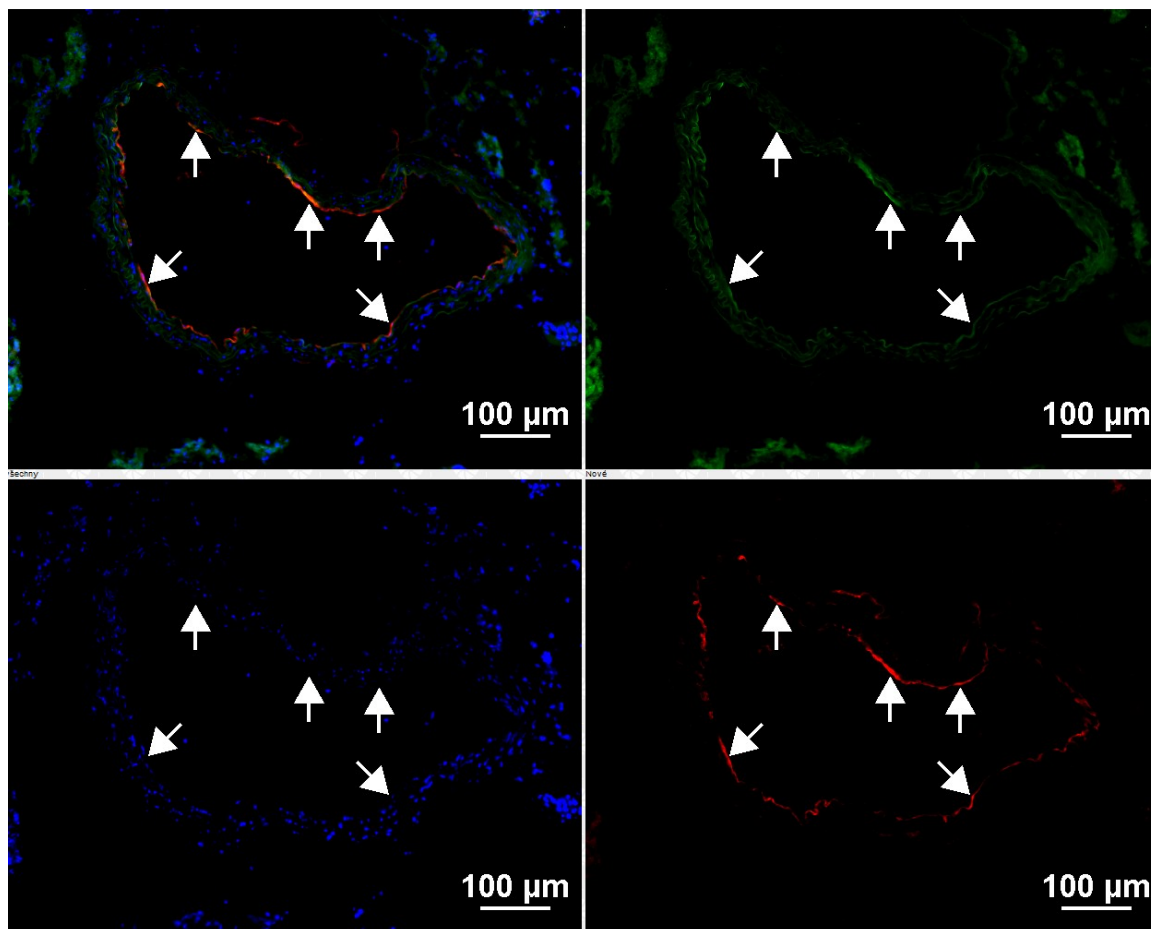
Obrázok č. 25: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie VCAM-1, myší model Sol-Eng<sup>+</sup>; mierka 100  $\mu$ m.



*Zelený kanál predstavuje autofluorescenciu tkaniva. Modrý zobrazuje bunkové jadrá a červený expresiu molekúl VCAM-1. Obrázok zložený zo všetkých kanálov znázorňuje endotelové bunky veľmi slabo produkujúce VCAM-1 (šípky). Expresia je slabšia a nie je viazaná na iné oblasti ako cievny endotel.*



Obrázok č. 26: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie VCAM-1, myší model Sol-Eng<sup>+</sup>; mierka 100  $\mu$ m



*Zelený kanál predstavuje autofluorescenciu tkaniva. Modrý zobrazuje bunkové jadrá a červený expresiu molekúl VCAM-1. Obrázok zložený zo všetkých kanálov znázorňuje výraznú exprimáciu VCAM-1 iba na povrchu endotelu. Imunohistochemické farbenie nepreukázalo významnú zmenu v expresii VCAM-1. Elastické blanky uložené v tunica média sú pozorovateľné ako pozdĺžne jemne zvlnené útvary s autofluorescenciou.*



## 4 Diskusia

Endoglin/CD105 (Eng) je prídavným receptorom typu III pre niektoré podtypy TGF- $\beta$ . Jedná sa o homodimérový transmembránový glykoproteín, molekulovej hmotnosti 180 kDa, s významnou funkciou v procese hematopoézy, angiogenézy, regulácie krvného tlaku a kardiovaskulárneho vývoja (62). Okrem endoglinu membránovo viazaného, boli pozorované zvýšené plazmatické hladiny jeho solubilnej formy (sEng), ktorá vzniká odštiepením NH<sub>2</sub>-konca z transmembránovo uloženého endoglinu pri ochoreniach kardiovaskulárneho systému (37).

Mnoho štúdií naznačuje význam solubilného endoglinu ako biomarkera endotelovej dysfunkcie pri preeklampsii (37), ateroskleróze (38) (39), hypercholesterolémii (40), diabete mellite a hypertenzii (41) či chronickej ischemickej chorobe srdca (63). Pri všetkých spomenutých patologických stavoch zohráva endotelová dysfunkcia kľúčovú úlohu, vysoké hladiny solubilného endoglinu sa zdajú byť jej charakteristickým znakom prispievajúcim zároveň k rozvoju mnohých kardiovaskulárnych chorôb (64). Solubilný endoglin sa uplatňuje aj pri regulácii funkcie TGF- $\beta$  signalizačnej dráhy vo vaskulárnom endotele (42).

V tejto diplomovej práci sme sledovali možnú infiltráciu makrofágov do aortálnej cievnej steny a expresiu bunkovo adhézne molekuly VCAM-1, ktorá je spájaná s endotelovou funkciou aj dysfunkciou. K detekcii makrofágov a expresie VCAM-1 v aorte myší s nízkou a vysokou hladinou solubilného endoglinu, kŕmených vysokotukovou diétou, sme použili fluorescenčné imunohistochemické metódy.

Podľa predchádzajúcej štúdie solubilný endoglin sám o sebe bez použitej diéty s vysokým obsahom tukov neovplyvňuje funkčné a morfológické vlastnosti aorty (46). To nasvedčuje, že iba vysoké hladiny solubilného endoglinu nespôsobia endotelovú dysfunkciu Sol-Eng<sup>+</sup> myší. Nevylučuje to však možnosť, že solubilný endoglin v kombinácii s ostatnými rizikovými faktormi kardiovaskulárnych ochorení prispieva k zmenám endotelovej funkcie. Diétu s vysokým obsahom tuku sme v tejto diplomovej práci použili práve pre možné zvýšenie rizika poškodenia endotelu v kombinácii s vysokými hladinami endoglinu.

Endotelovú dysfunkciu charakterizuje narušenie schopnosti vaskulárnej relaxácie nadobudnutej zníženou dostupnosťou NO, ako následok nedostatočnej produkcie endotelovou NO-syntázou alebo pôsobením kyslíkových radikálov (53) (65). Na nedostatočnú tvorbu NO majú vplyv aj prezápalové bunkovo adhézne molekuly VCAM-

1 a ICAM-1 (66) – ich zvýšená expresia je spájaná s defektom NO, ako aj so vzrastajúcou migráciou makrofágov do intimy ciev. To je považované za prvý krok v rozvoji aterosklerózy (67).

V tejto diplomovej práci sme nepotvrdili prítomnosť makrofágov v intime alebo v inej časti aorty myší z kontrolnej a ani v skupine myší s vysokou hladinou solubilného endoglínu. Získané výsledky naznačujú, že vplyvom podávanej vysokotukovej diéty nedošlo k žiadnemu osídleniu testovanej časti descendentnej aorty makrofágmi. Zároveň vysoké plazmatické hladiny solubilného endoglínu spolu s vysokotukovou diétou v nami skúmaných cievach neovplyvnili obsadenie intimy makrofágmi.

Expresiu VCAM-1, ako bunkovo adhézne molekuly preukázateľne sa podieľajúcej na progrese endotelovej dysfunkcie a s tým spätým aterosklerotickým rozvojom (68) (69), sme detekovali na endotele v oboch skupinách. Napriek tomu, že VCAM-1 bola detekovaná v makrofágoch aterosklerotického plátu, ju môžeme vnímať ako biomarker endotelovej dysfunkcie (70). Naše výsledky poukazujú na zvýšenú expresiu VCAM-1 v oboch skupinách. To mohlo byť zapríčinené pravdepodobným vznikom endotelovej dysfunkcie po podávanej diéte s vysokým obsahom tuku. Charakter farbenia, intenzita a lokalizácia VCAM-1 sa nelíšila naprieč kontrolnou skupinou a ani skupinou myší s vysokou hladinou endoglínu.

Môžeme teda predpokladať, že solubilný endogglín neprispieva k rozdielnej expresii VCAM-1 a neovplyvňuje výskyt makrofágov v cievnej stene. Nemôžeme však vylúčiť možnosť, že odlišnými metódami, napr. funkčnou analýzou aorty či určením ďalších markerov, by sa mohli získať odlišné výsledky odôvodnené pôsobením solubilného endoglínu na endotelové funkcie.

## **5 Záver**

V tejto diplomovej práci sme pomocou imunohistochemických metód sledovali expresiu adhéznej molekuly VCAM-1 a výskyt makrofágov v stene aorty myši s nízkymi a vysokými hladinami solubilného endoglínu, ktoré boli na vysokotukovej diéte. Imunohistochemická analýza nedokázala osídlenie descendentnej aorty makrofágmi u žiadnej testovanej myši ako z kontrolnej, tak aj zo skupiny so zvýšenými hladinami solubilného endoglínu.

Expresia VCAM-1 bola viazaná iba na povrch cievneho endotelu v oboch skupinách. Ani v tomto prípade sme nezaznamenali rozdielnu expresiu VCAM-1 na základe rozdielnych hladín solubilného endoglínu.

Získané výsledky v tejto diplomovej práci nepotvrdili indukciu endotelovej dysfunkcie u myši s vysokými hladinami solubilného endoglínu na základe porovnania expresie VCAM-1 a pozorovania infiltrácie makrofágov. Na odhalenie možného vplyvu vysokých hladín solubilného endoglínu na cievnu stenu sú teda potrebné ďalšie metodické prístupy a sledovanie iných biomarkerov.

## 6 Použité skratky

ABC – avidín-biotín komplex

ACE – angiotenzín konvertujúci enzým

ALK – activin receptor-like kináza

ApoE – apolipoprotein E

BSA – bovine serum albumin (hovädzí sérový albumín)

CAM – bunkovo adhézne molekuly (cell adhesion molecule)

CD 105 – endoglin

CSF - kolónie stimulujúce faktory (colony stimulating factors)

DABCO – 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octan

DAPI – 4',6-diamidin-2-fenylindol

EGF – endotelový rastový faktor (endothelial growth factor)

HDL – lipoproteíny s vysokou hustotou (high density lipoproteins)

ICAM-1 – intercellular adhesion molecule

IFN – interferón

IFN- $\alpha$  – interferón  $\alpha$

IFN- $\beta$  – interferón  $\beta$

IFN- $\gamma$  – interferón  $\gamma$

IL-1 – interleukín 1

IL-10 – interleukín 10

IL-13 – interleukín 13

IL-4 – interleukín 4

IL-6 – interleukín 6

IL-8 – interleukín 8

KVO - kardiovaskulárne choroby

LDL – lipoproteíny s nízkou hustotou (low density lipoproteins)

LXR – špecifické jadrové receptory

MMP-14 – matrixová metalloproteináza

NK bunky – natural killer bunky

NO – oxid dusnatý

OTC – zmrazovacia zmes (tissue freezing medium)

Ox-LDL – oxidované LDL-častice

PAI – inhibítor plazmínogénu

PBS – fosfátový pufo (phosphate-buffered saline)

PDGF – doštičkový rastový faktor (platelet-derived growth factor)

PECAM-1 – platelet-endothelial cell adhesion molecule 1

PGI<sub>2</sub> – prostacyklín

RXR – špecifické jadrové receptory

s CD 105 – solubilný endoglin

Smad – intracelulárne signálne proteíny

Sol-Eng<sup>+</sup> - solubilný endoglin

TAG – triacylglyceroly

TGF – transformujúci rastový faktor

TNF – Tumor nekrotizujúci faktor

TNF- $\alpha$  – Tumor nekrotizujúci faktor  $\alpha$

TNF- $\beta$  – Tumor nekrotizujúci faktor  $\beta$

t-PA – tkanivový aktivátor plazminogénu

TXA<sub>2</sub> – tromboxan A<sub>2</sub>

VCAM-1 – vascular cell adhesion molecule 1

VEGF – vascular endothelial growth factor

VLDL – lipoproteíny s veľmi nízkou hustotou (very low density lipoproteins)

## 7 Citovaná literatura

1. VLČEK, Jiří, Daniela FIALOVÁ a Magda VYTRŽISALOVÁ. *Klinická farmacie. 1.* vyd. Praha: Grada, Publishing a.s., 2010. s. 93-98, 108-111. ISBN: 978-80-247-3169-8.
2. [online]. [cit. 2015-03-28]. Dostupné z: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/en/>.
3. MACIEJKO, James J. *Atherosclerosis risk factors*. Washington, DC: AACC Press, c2004. s. 35-36. ISBN 1594250049.
4. ČEŠKA, Richard. *Cholesterol a ateroskleróza, léčba dyslipidemií*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2005. s. 15-29. ISBN 80-7254-738-0.
5. GARTNER, Leslie P a James L HIATT. *Color atlas of histology*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, c2009. s. 161-167. ISBN 9781451107210.
6. ČIHÁK, R. *Anatomie 3*. 2. vyd. Grada, Praha, 2002. s. 69-76. ISBN: 80-7169-140-2.
7. HULÍN, Ivan. *Patofyziologie*. 5. aktualiz. vyd. Bratislava: SAP, 1998. s. 79-82, 443-529. ISBN 8088908078.
8. Simon BC, Noll B, Maisch B. Endothelial dysfunction--assessment of current status and approaches to therapy. *Herz*. 1999 Feb;24(1): 62-71. Review. Germany. PubMed PMID: 10093015
9. KÖLBEL, František. *Praktická kardiologie*. Vyd. 1. Praha: Karolinum, 2011. s. 78-79. ISBN 9788024619620.
10. Sarah Jane George, Jason Johnson. *Atherosclerosis: molecular and cellular mechanisms*. Weinheim: Wiley-VCH, c2010. s. 5-7, 10-12. ISBN 9783527324484.
11. BARTUŇKOVÁ, Jiřina, Anna ŠEDIVÁ a Aleš JANDA. *Imunodeficiencie*. 2., přeprac. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2007. s. 35-49. ISBN 978-80-247-1980-1.
12. MARTÍNKOVÁ, Jiřina. *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2007. s. 213 – 215. ISBN 978-80-247-1356-4.
13. KLENER, Pavel. *Cytokiny ve vnitřním lékařství*. Vyd. 1. Praha: Grada, 1997. s. 145-155. ISBN 80-7169-335-9.
14. KITTNAR, Otomar. *Lékařská fyziologie*. 1. vyd. Praha: Grada, 2011. s. 73-76. ISBN 978-802-4730-684.
15. Kume N, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules

- incultured human and rabbit arterial endothelial cells. *J Clin Invest.* 1992 Sep;90(3): 1138-1144. PubMed PMID: 1381720; PubMed Central PMCID: PMC329976.
16. De Caterina R, Libby P, Peng HB, Thannickal VJ, Rajavashisth TB, Gimbrone MA Jr, Shin WS, Liao JK. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest.* 1995 Jul;96(1): 60-68. PubMed PMID: 7542286; PubMed Central PMCID: PMC185173.
  17. BOCHNER, Ed. by Bruce S. *Adhesion molecules in allergic disease.* New York [u.a.]: Dekker, 1997, s. 73-77. ISBN 978-082-4798-369.
  18. Haskard D.O. Pro-inflammatory adhesins. In: Catravas J.D., Callow A.D., Ryan U.S. (Eds.): *Vascular Endothelium: Responses to injury.* New York.London, Plenum Press 1996, s. 145.154. ISBN - 13:978-1-4613-8013-9.
  19. BARTUŇKOVÁ, Jiřina. *Vyšetřovací metody v imunologii.* 2., přeprac. a dopl. vyd. Editor Milan Paulík. Praha: Grada, 2011. s. 25-26. ISBN 978-802-4735-337.
  20. JÍLEK, Petr. *Imunologie: stručně, jasně, přehledně.* 4. vyd., V Grada Publishing 1. Editor Milan Paulík. Praha: Grada, 2014. s. 68. ISBN 978-802-4748-221.
  21. FERENČÍK, Miroslav. *Imunitní systém: informace pro každého.* 1. vyd. Překlad Kristýna Pokorná. Praha: Grada Publishing, c2005. s.39-41. ISBN 80-247-1196-6.
  22. VOKURKA, Martin. *Patofyziologie pro nelékařské směry.* 1. vyd. Praha: Karolinum, 2005, Učební texty Univerzity Karlovy v Praze. s. 53-54. ISBN 80-246-0896-0.
  23. ŠTEJFA, Miloš. *Kardiologie.* 3., přepr. a dopl. vyd. Praha: Grada, 2007. s. 53-54. ISBN 978-802-4713-854.
  24. Li C, Hampson IN, Hampson L, Kumar P, Bernabeu C, Kumar S. CD105 antagonizes the inhibitory signaling of transforming growth factor beta1 on human vascular endothelial cells. *FASEB J.* 2000 Jan a 10627280., 14(1): 55-64. PubMed PMID: 10627280.
  25. Conley BA, Smith JD, Guerrero-Esteo M, Bernabeu C, Vary CP. Endoglin, a TGF-beta receptor-associated protein, is expressed by smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques. *Atherosclerosis.* 2000 Dec;153(2): 323-335. PubMed PMID: 11164421.

26. Blanco FJ, Grande MT, Langa C, Oujo B, Velasco S, Rodriguez-Barbero A, Perez-Gomez E, Quintanilla M, López-Novoa JM, Bernabeu C. S-endoglin expression is induced in senescent endothelial cells and contributes to vascular pathology. *Circ Res.* 2008 Dec 5;103(12): 1383-1892. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.176552. Epub 2008 Oct 30. PubMed PMID: 18974388.
27. Massagué J, Wotton D. Transcriptional control by the TGF-beta/Smad signaling system. *EMBO J.* 2000 Apr 17;19(8): 1745-1754. Review. PubMed PMID: 10775259; PubMed Central PMCID: PMC302010.
28. Chen JK, Hoshi H, McKeehan WL. Transforming growth factor type beta specifically stimulates synthesis of proteoglycan in human adult arterial smooth muscle cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Aug;84(15): 5287-5291. PubMed PMID: 3474655; PubMed Central PMCID: PMC298840.
29. Singh NN, Ramji DP. The role of transforming growth factor-beta in atherosclerosis. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2006 Dec;17(6): 487-499. Epub 2006 Oct 23. Review. PubMed PMID: 17056295.
30. Mallat Z, Gojova A, Marchiol-Fournigault C, Esposito B, Kamaté C, Merval R, Fradelizi D, Tedgui A. Inhibition of transforming growth factor-beta signaling accelerates atherosclerosis and induces an unstable plaque phenotype in mice. *Circ Res.* 2001 Nov 9;89(10): 930-934. PubMed PMID: 11701621.
31. van Meeteren LA, Goumans MJ, ten Dijke P. TGF- $\beta$  receptor signaling pathways in angiogenesis; emerging targets for anti-angiogenesis therapy. *Curr Pharm Biotechnol.* 2011 Dec;12(12): 2108-2120. Review. PubMed PMID: 21619534.
32. Moustakas A, Heldin CH. The regulation of TGFbeta signal transduction. *Development.* 2009 Nov;136(22): 3699-3714. doi: 10.1242/dev.030338. Review. PubMed PMID: 19855013.
33. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P, ten Dijke P. Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF-beta type I receptors. *EMBO J.* 2002 Apr 2;21(7): 1743-1753. PubMed PMID: 11927558; PubMed Central PMCID: PMC125949.
34. Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C, Karlsson S, ten Dijke P. Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGFbeta/ALK5 signaling. *Mol Cell.* 2003 Oct;12(4): 817-828. PubMed PMID: 14580334.



35. Feinberg MW, Jain MK. Role of transforming growth factor-beta1/Smads in regulating vascular inflammation and atherogenesis. *Panminerva Med.* 2005 Sep;47(3): S169-186. Review. PubMed PMID: 16462725.
36. Lebrin F, Deckers M, Bertolino P, Ten Dijke P. TGF-beta receptor function in the endothelium. *Cardiovasc Res.* 2005 Feb 15;65(3): 599-608. Review. PubMed PMID: 15664386.
37. Venkatesha S, Toporsian M, Lam C, Hanai J, Mammoto T, Kim YM, Bdolah Y, Lim KH, Yuan HT, Libermann TA, Stillman IE, Roberts D, D'Amore PA, Epstein FH, Sellke FW, Romero R, Sukhatme VP, Letarte M, Karumanchi SA. Soluble endoglin contributes to the pathogenesis of preeclampsia. *Nat Med.* 2006 Jun;12(6):642-649. Epub 2006 Jun 4. Erratum in: *Nat Med.* 2006 Jul;12(7): 862. PubMed PMID: 16751767.
38. Blann AD, Wang JM, Wilson PB, Kumar S. Serum levels of the TGF-beta receptor are increased in atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1996 Feb;120(1-2): 221-226. PubMed PMID: 8645363.
39. Strasky Z, Vecerova L, Rathouska J, Slanarova M, Brackova E, Kudlackova Z, Andrys C, Micuda S, Nachtigal P. Cholesterol effects on endoglin and its downstream pathways in ApoE/LDLR double knockout mice. *Circ J.* 2011;75(7): 1747-1755. Epub 2011 May 17. PubMed PMID: 21576826.
40. Blaha M, Cermanova M, Blaha V, Jarolim P, Andrys C, Blazek M, Maly J, Smolej L, Zajic J, Masin V, Zimova R, Rehacek V. Elevated serum soluble endoglin (sCD105) decreased during extracorporeal elimination therapy for familial hypercholesterolemia. *Atherosclerosis.* 2008 Mar;197(1): 264-270. Epub 2007 May 30. PubMed PMID: 17540382.
41. Blázquez-Medela AM, García-Ortiz L, Gómez-Marcos MA, Recio-Rodríguez JI, Sánchez-Rodríguez A, López-Novoa JM, Martínez-Salgado C. Increased plasma soluble endoglin levels as an indicator of cardiovascular alterations in hypertensive and diabetic patients. *BMC Med.* 2010 Dec 20;8: 86. doi: 10.1186/1741-7015-8-86. PubMed PMID: 21171985; PubMed Central PMCID: PMC3012013.
42. Walshe TE, Dole VS, Maharaj AS, Patten IS, Wagner DD, D'Amore PA. Inhibition of VEGF or TGF- $\beta$  signaling activates endothelium and increases leukocyte rolling. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009 Aug;29(8): 1185-1192. doi:

- 10.1161/ATVBAHA.109.186742. Epub 2009 May 21. PubMed PMID: 19461051; PubMed Central PMCID: PMC2775449.
43. Gregory AL, Xu G, Sotov V, Letarte M. Review: the enigmatic role of endoglin in the placenta. *Placenta*. 2014 Feb;35 Suppl: S93-99. doi: 10.1016/j.placenta.2013.10.020. Epub 2013 Nov 8. Review. PubMed PMID: 24252708
  44. Valbuena-Diez AC, Blanco FJ, Oujo B, Langa C, Gonzalez-Nuñez M, Llano E, Pendas AM, Díaz M, Castrillo A, Lopez-Novoa JM, Bernabeu C. Oxysterol-induced soluble endoglin release and its involvement in hypertension. *Circulation*. 2012 Nov 27;126(22): 2612-2624. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.112.101261. Epub 2012 Oct 30. PubMed PMID: 23110859.
  45. Cui S, Lü SZ, Chen YD, He GX, Meng LJ, Liu JP, Song ZY, Liu XL, Song XT, Ge CJ, Liu H. Relationship among soluble CD105, hypersensitive C-reactive protein and coronary plaque morphology: an intravascular ultrasound study. *Chin Med J (Engl)*. 2008 Jan 20;121(2): 128-132. PubMed PMID: 18272038.
  46. Ivana Nemeckova, Agnieszka Serwaczak, Barbara Oujo, Katerina Jezkova, Jana Rathouska, Petra Fikrova, Michala Varejckova, Carmelo Bernabeu, Jose M. Lopez-Novoa, Stefan Chlopicki, Petr Nachtigal. High Soluble Endoglin Levels Do Not Induce Endothelial Dysfunction in Mouse Aorta. *PLoS One*. 2015; 10(3): e0119665. Published online 2015 March 13. doi: 10.1371/journal.pone.0119665 PMCID: PMC4359129.
  47. Carlos Zaragoza, Carmen Gomez-Guerrero, Jose Luis Martin-Ventura, Luis Blanco-Colio, Begoña Lavin, Beñat Mallavia, Carlos Tarin, Sebastian Mas, Alberto Ortiz, Jesus Egido J. Animal Models of Cardiovascular Diseases. *Biomed Biotechnol*. 2011; 2011: 497841. Published online 2011 February 16. doi: 10.1155/2011/497841 PMCID: PMC3042667
  48. Jawień J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol*. 2004 Sep;55(3): 503-517. Review. PubMed PMID: 15381823.
  49. Whitman SC. A practical approach to using mice in atherosclerosis research. *Clin Biochem Rev*. 2004 Feb;25(1): 81-93. PubMed PMID: 18516202; PubMed Central PMCID: PMC1853358.
  50. Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, de Vries-Van der Weij J, van der Hoorn J, Princen HM, Kooistra T. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical

- modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007 Aug;27(8): 1706-1721. Epub 2007 May 31. Review. PubMed PMID: 17541027.
51. Paigen B, Morrow A, Brandon C, Mitchell D, Holmes P. Variation in susceptibility to atherosclerosis among inbred strains of mice. *Atherosclerosis.* 1985 Oct;57(1): 65-73. PubMed PMID: 3841001.
  52. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein. *E. Science.* 1992 Oct 16;258(5081): 468-471. PubMed PMID: 1411543.
  53. Davignon J, Cohn JS, Mabile L, Bernier L. Apolipoprotein E and atherosclerosis: insight from animal and human studies. *Clin Chim Acta.* 1999 Aug;286(1-2): 115-143. Review. PubMed PMID: 10511288.
  54. Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb.* 1994 Jan;14(1): 133-140. PubMed PMID: 8274468.
  55. Knowles JW, Maeda N. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Nov;20(11): 2336-2345. Review. PubMed PMID: 11073835; PubMed Central PMCID: PMC4321895.
  56. Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. *Science.* 1996 May3;272(5262): 685-688. Review. PubMed PMID: 8614828.
  57. Sjöland H, Eitzman DT, Gordon D, Westrick R, Nabel EG, Ginsburg D. Atherosclerosis progression in LDL receptor-deficient and apolipoprotein E-deficient mice is independent of genetic alterations in plasminogen activator inhibitor-1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000 Mar;20(3): 846-852. PubMed PMID: 10712412.
  58. MASSEYEFF, René F, W ALBERT a Norman STAINES. *Methods of immunological analysis.* Vol. 3. Weinheim: VCH, 1993. s. 1-8, 229-274. ISBN 3527279083.
  59. DABBS, David J.. *Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic applications.* 4th ed..Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier, 2014. s. 5-8, ISBN 9781455744619.
  60. BRYCHTOVÁ, Svetlana a Alice HLOBILKOVÁ. *Histopatologický atlas.* 1. vyd. Praha: Grada, 2008. s. 9. ISBN 978-802-4716-503

61. BUCHWALOW, Igor B a Werner BÖCKER. *Immunohistochemistry: basics and methods*. New York: Springer, c2010. s. 52. ISBN 36-420-4609-6.
62. López-Novoa JM, Bernabeu C. The physiological role of endoglin in the cardiovascular system. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010 Oct;299(4): H959-974. doi: 10.1152/ajpheart.01251.2009. Epub 2010 Jul 23. Review. PubMed PMID: 20656886.
63. Ikemoto T, Hojo Y, Kondo H, Takahashi N, Hirose M, Nishimura Y, Katsuki T, Shimada K, Kario K. Plasma endoglin as a marker to predict cardiovascular events in patients with chronic coronary artery diseases. *Heart Vessels*. 2012 Jul;27(4): 344-351. doi: 10.1007/s00380-011-0163-z. Epub 2011 Jun 11. PubMed PMID: 21667051.
64. Nachtigal P, Zemankova Vecerova L, Rathouska J, Strasky Z. The role of endoglin in atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 2012 Sep;224(1): 4-11. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2012.03.001. Epub 2012 Mar 9. Review. PubMed PMID: 22460049.
65. Higashi Y, Noma K, Yoshizumi M, Kihara Y. Endothelial function and oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J*. 2009 Mar;73(3): 411-418. Epub 2009 Feb 4. Review. PubMed PMID: 19194043.
66. Joseph-Silverstein J, Silverstein RL. Cell adhesion molecules: an overview. *Cancer Invest*. 1998;16(3): 176-182. Review. PubMed PMID: 9541632.
67. Linton MF, Fazio S. Macrophages, inflammation, and atherosclerosis. *Int J Obes Relat Metab Disord*. 2003 Dec;27 Suppl 3: S35-40. Review. PubMed PMID: 14704742.
68. Bourdillon MC, Poston RN, Covacho C, Chignier E, Bricca G, McGregor JL. ICAM-1 deficiency reduces atherosclerotic lesions in double-knockout mice (ApoE(-/-)/ICAM-1(-/-)) fed a fat or a chow diet. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 Dec;20(12): 2630-2635. PubMed PMID: 11116064.
69. Davies MJ, Gordon JL, Gearing AJ, Pigott R, Woolf N, Katz D, Kyriakopoulos A. The expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1, PECAM, and E-selectin in human atherosclerosis. *J Pathol*. 1993 Nov;171(3): 223-229. PubMed PMID: 7506307.
70. Nakashima Y, Raines EW, Plump AS, Breslow JL, Ross R. Upregulation of VCAM-1 and ICAM-1 at atherosclerosis-prone sites on the endothelium in the

ApoE-deficient mouse. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1998 May;18(5): 842-851.  
PubMed PMID: 9598845.

## 8 Zoznam obrázkov

Obrázok č. 1: Stavba cievnej steny, porovnanie tepny, žily a kapiláry .....	10
Obrázok č. 2: Koncentricky usporiadané jednotlivé vrstvy steny ciev .....	10
Obrázok č. 3: Zmeny v stavbe cievnej steny v súvislosti s lokalizáciou cievy.....	12
Obrázok č. 4: Znázornenie endotelových funkcií .....	14
Obrázok č. 5: Príčiny a dôsledky endotelovej dysfunkcie.....	15
Obrázok č. 6: Postupný rozvoj aterosklerotického plátu .....	16
Obrázok č. 7: Štruktúra lipoproteínovej častice .....	17
Obrázok č. 8: Patogenéza aterosklerotického plátu.....	19
Obrázok č.9 a: Tukový prúžok.....	20
Obrázok č.9 b: Fibrózny plát.....	20
Obrázok č.9 c: Komplikovaný plát.....	21
Obrázok č.9 d: Ruptúra plátu .....	21
Obrázok č. 10: Stabilný a nestabilný plát .....	22
Obrázok č. 11: Prestup leukocytu endotelom .....	23
Obrázok č. 12: TGF- $\beta$ signálna dráha .....	28
Obrázok č. 13: Solubilný endoglin.....	28
Obrázok č. 14: Porovnanie rozvoja plátu u apoE deficientného a wild type kmeňa pri rovnakých podmienkach a strave .....	30
Obrázok č. 15: Priama a nepriama metóda .....	31
Obrázok č. 16: Metóda avidín-biotín komplex .....	32
Obrázok č. 17: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie makrofágov, kontrolná skupina; zväčšenie 10x. ....	38
Obrázok č. 18: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie makrofágov, kontrolná skupina; zväčšenie 10x. ....	39
Obrázok č. 19: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie makrofágov, myši model .....	40
Obrázok č. 20: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie makrofágov, myši model .....	41

Obrázok č. 21: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie VCAM-1, kontrolná skupina; zväčšenie 10x. ....	43
Obrázok č. 22: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie VCAM-1, kontrolná skupina; zväčšenie 10x. ....	44
Obrázok č. 23: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie VCAM-1, kontrolná skupina; zväčšenie 10x. ....	45
Obrázok č. 24: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie VCAM-1, myší model Sol-Eng+; zväčšenie 10x. ....	46
Obrázok č. 25: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie VCAM-1, myší model Sol-Eng+; zväčšenie 10x. ....	47
Obrázok č. 26: Fluorescenčné imunohistochemické farbenie VCAM-1, myší model Sol-Eng+; zväčšenie 10x. ....	48

## 9 Zoznam tabuliek

Tabuľka č. 1: Optimálne plazmatické hodnoty lipidov .....	18
Tabuľka č. 2: Adhézne molekuly regulujúce extravazáciu leukocytu .....	25